Untersuchungen über den Stoffwechsel von Schlafmitteln unter Benützung von Tritium- und ^{14}C-Signierungen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
JEAN-DANIEL GOETSCHEL
von Löwenburg-Pleigne (Bern)

1962

VERLAG P. G. KELLER - WINTERTHUR 1963

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546021_0110

Untersuchungen über den Stoffwechsel von Schlafmitteln unter Benützung von Tritium- und ^{14}C-Signierungen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
JEAN-DANIEL GOETSCHEL
von Löwenburg-Pleigne (Bern)

VERLAG P. G. KELLER - WINTERTHUR 1963

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. K. Bernhard und Dr. K. Meyer.

Basel, den 28. November 1962

Prof. Dr. M. Eichler
Dekan

Meinem lieben Vater
in Dankbarkeit gewidmet

Herrn Prof. Dr. Karl Bernhard, auf dessen Veranlassung die vorliegende Arbeit entstand, möchte ich an dieser Stelle für seine Unterstützung und Förderung danken.

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung

A. Isotopensignierung 7

B. Tritiumsignierung 8

Zur Verteilung von 5-Aethyl-5-(1-methylbutyl-)barbitursäure im Zentralnervensystem

A. Allgemeines 10

B. Signierung der Aethyl-methylbutyl-barbitursäure 11

1. Methode 11
2. Experimentelles 12

C. Verteilung und Ausscheidung 14

1. Methode 14
2. Experimentelles 15

D. Ergebnisse 17

E. Diskussion der Ergebnisse 21

Isolierung und Strukturaufklärung von Metaboliten der 5-Aethyl-5-cycloheptenyl-barbitursäure

A. Allgemeines 24

B. Isolierung und Identifizierung der Metaboliten 25

1. Methode 25
2. Identifizierung der Metaboliten Ia und Ib 26
3. Identifizierung von Metabolit II 27
4. Experimentelles 29

C. Strukturaufklärung der Metaboliten Ia und Ib 30

1. Allgemeines 30
2. Theoretischer Teil 31

D. Synthese von ^{14}C-signierter 5-Aethyl-5-cycloheptenyl-barbitursäure 34

1. Theoretischer Teil 34
2. Experimentelles 36

a) Modellversuche mit inaktivem Material 36
b) Synthese von 5-Aethyl-5-cycloheptenyl-(1'-^{14}C-)barbitursäure 37

E. Experimentelles 42

1. Gewinnung von aktiven Metaboliten 42
2. Trennung der Metaboliten 43
3. Oxydativer Abbau der Metaboliten Ia und Ib 44

F. Ergebnisse und Diskussion 44

1. Metaboliten Ia und Ib 44
2. Metabolit II 45

Zusammenfassung 46

Literaturverzeichnis 47

Einleitung

Bei der Untersuchung von Stoffwechselprozessen ergibt sich die Schwierigkeit, dass der Organismus meist aus denselben Substanzen aufgebaut ist, deren Schicksal verfolgt werden soll. Es lässt sich nicht ohne weiteres entscheiden, ob ein isoliertes Produkt einer exogen zugeführten Substanz oder dem Stoffwechselbestand des Organismus entstammt. Diese Schwierigkeit lässt sich durch die Markierung der zu untersuchenden Substanz mit Hilfe von Isotopen, insbesondere radioaktiver Isotopen, beheben. Die Verwendung der stabilen und radioaktiven Isotope führt daher zu neuen Erkenntnissen, die ohne diese Hilfsmittel nicht erhältlich wären. Auch zu Untersuchungen über das Verhalten körperfremder Substanzen im Organismus wurde die Isotopensignierung in den letzten Jahren immer mehr herangezogen.

Die vorliegende Arbeit ist ein Beitrag zur Kenntnis des Barbiturat-Stoffwechsels und illustriert die Anwendungsmöglichkeit von zwei radioaktiven Isotopen, ^{3}H und ^{14}C, einerseits zur Untersuchung der Verteilung eines Barbiturates im Zentralnervensystem und andererseits zur Aufklärung der Struktur von Metaboliten eines anderen Barbiturates.

Ferner erleichtert die Isotopentechnik die Erforschung weiterer Vorgänge wie Resorption, Assimilation und Ausscheidung. Die Radioelemente erlauben, mit sehr kleinen Substanzmengen zu arbeiten. So wurde es möglich, die Verteilung lebensnotwendiger Elemente wie Calcium, Phosphor und Eisen nicht nur in pharmakologisch, sondern auch in physiologisch wirksamen Dosen zu verfolgen. Markierte Substanzen zeichnen sich durch ihre leichte Nachweisbarkeit aus. Radioaktive Isotope lassen sich selbst auf Papierchromatogrammen nachweisen.

A. Isotopensignierung

Es gibt prinzipiell drei Methoden:

1. die Synthese in vitro,
2. die biologische und mikrobiologische Synthese,
3. das Austauschverfahren.

Die chemische Synthese ist oft mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Ein an und für sich schon kompliziertes Verfahren muss mit sehr kleinen Ansätzen ausgeführt und entsprechend modifiziert und adaptiert werden, damit die eingesetzte radioaktive Substanz quantitativ umgesetzt wird. Das isotope Material sollte möglichst erst spät eingeführt werden können und die gewünschte Verbindung mit guter Ausbeute hohe spezifische Aktivitäten liefern. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Vorschriften zur Synthese einer grossen Reihe signierter Verbindungen mitgeteilt.

Die Signierung auf biologischem Weg liefert unspezifisch markierte Verbindungen von zumeist grosser Verwendungsmöglichkeit bei der Erforschung von Problemen des intermediären Stoffwechsels. Putman und Mitarbeiter verwendeten die Tabakpflanze zur Gewinnung von ^{14}C-markierten Zuckern. Durch Züchtung eines Schimmelpilzes (Phycomyces Blakesleeanus) in ^{14}C-Acetat-haltiger Nährlösung erhielten Bernhard und Mitarbeiter an zahlreichen C-Atomen ^{14}C-signierte Fettsäuren. Durch diese Methode kann man nicht nur komplexe Verbindungen wie z. B. Haemoglobin signieren, sondern auch Mikroorganismen und höhere Lebewesen wie z. B. Fliegen. Durch Züchtung in einem ^{32}P-haltigen Milieu wurden markierte Tabakmosaikviren, Streptokokken und Colibazillen gewonnen und ihr Schicksal nach Injektion an höhere Organismen verfolgt. Die spezifischen Aktivitäten solcher Verbindungen sind begrenzt. Werden erstere zu hoch gewählt, so können die Strahlenwirkungen den verwendeten Organismus schädigen.

Die einfachsten Verfahren sind die Austauschreaktionen. Sie sind aber auf einige wenige Isotope wie Jod, Deuterium und Tritium beschränkt. Eine oft mühsame Synthese bleibt erspart, indem man die zu markierende Substanz direkt unter bestimmten Bedingungen mit dem Isotop zur Reaktion bringt. Hochaktives ^{131}J-markiertes Thyroxin entsteht, wenn man Thyroxin mit ^{131}J während 12 Stunden am Rückfluss erhitzt. Die klassische Totalsynthese mit über 10 Stufen und einer Ausbeute von weniger als 5 % ist sehr zeitraubend und mit grossen Aktivitätsverlusten verbunden, da die Halbwertszeit von ^{131}J nur 8 Tage beträgt.

B. Tritiumsignierung

Die Tritiumsignierung eignet sich besonders für Bilanz- und Verteilungsversuche von Substanzen, die nicht oder kaum abgebaut werden.

Tritium kann mit Erfolg nur für die Signierung von gesättigten aliphatischen und aromatischen C—H-Bindungen verwendet werden. Zur Markierung von $-NH_2$, $-OH$, $-COOH$-Gruppen eignet es sich nicht. Diese Bindungen sind labil, in wässerigem Milieu stellt sich bei genügender Dissoziation sehr rasch ein Tritiumgleichgewicht zwischen der markierten Verbindung und dem Wasser ein. So signierte Verbindungen verlieren mehr oder weniger schnell ihr Tritium durch Austausch mit dissoziiertem Wasserstoff der Körperflüssigkeit, können also zu Signierungsversuchen nicht herangezogen werden.

Die Einführung von Tritium in eine organische Verbindung kann entweder auf chemisch-synthetischem Weg geschehen, durch das Austauschverfahren mit Tritiumgas oder durch katalytische Hydrierung einer ungesättigten Verbindung.

Sheppard, Mowles, Bowen, Renzi und Plummer (1) untersuchten die Verteilung und Ausscheidung von Tritium-markiertem Hydrochlorthiazid, welches aus Chlorthiazid durch Reduktion mit Tritium-markiertem Natriumborhydrid hergestellt wurde. Durch katalytische Hydrierung mit Palladium und Tritiumgas konnten Glascock und Pope (2) Hexoestrol aus Dienoestrol gewinnen. Das Austauschverfahren mit Tritiumgas ist die einfachere Methode. Sie liefert aber Verbindungen mit relativ schwächerer Aktivität. Durch die Strahlenwirkung können radioaktive Zersetzungsprodukte entstehen, die entfernt werden müssen. Ebenfalls müssen labil gebundene Tritiumatome eliminiert werden. Wilzbach (3) signierte verschiedenartige Substanzen auf diesem Weg wie Heptan, Toluol, Cholesterin, Digitoxin. Wir haben diese Methode für die Signierung eines Barbiturates gewählt.

Zur Verteilung von 5-Aethyl-5-(1-methylbutyl-) barbitursäure im Zentralnervensystem

A. Allgemeines

Der Metabolismus der Aethyl-methylbutyl-barbitursäure war in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Arbeiten. Gleichzeitig haben verschiedene Autoren die Verteilung dieses Barbiturates im Organismus untersucht. Brodie und Mitarbeiter (4) ermittelten durch UV-Spektrophotometrie die Pentobarbitalkonzentrationen in einzelnen Organen, Plasma, Liquor, Fettgewebe, beim Hunde und die Plasmakonzentration beim Menschen. UnterVerwendung eines ^{14}C-signierten Präparates untersuchte Kahn (5) die Ausscheidung und Verteilung bei der Ratte. Einerseits wurde die unveränderte Aethyl-methylbutyl-barbitursäure aus verschiedenen Geweben extrahiert und andererseits die gesamte Radioaktivität (unverändertes Pentobarbital und Metaboliten) in Blut, Herz, Zwerchfell, Magen-Darm, Niere, Milz, Lunge, Hirnrinde und subcorticalen Zentren bestimmt. Eine Untersuchung über die Verteilung dieses zentral wirkenden Pharmakons in den verschiedenen Abschnitten des Zentralnervensystems wurde hingegen nie durchgeführt.

Verschiedene Arbeiten führten zum Resultat, dass sich pharmakologisch wirksame Substanzen im Gehirn nicht gleichmässig verteilen. Nach Gaben eines Psychoanaleptikums, des Phenyl-piperidyl-essigsäuremethylesters (Ritalin) zeigten die einzelnen Abschnitte des Zentralnervensystems eine verschiedene Anreicherung (6). Die spezifischen Aktivitäten waren für das Gross- und Stammhirn durchwegs höher als für Kleinhirn, Medulla oblongata und Rückenmark. Nach Gaben von Veronal, einem langwirkenden Dauerschlafmittel, prüften Goldschmidt und Mitarbeiter (7) auf spektrophotometrischem Wege den Barbiturat-Gehalt des Gesamthirnes, des Cortex, des Kleinhirnes und der Medulla bei der Ratte. Nach intraperitonealer Injektion von 30 mg Natriumveronal wurde der höchste Gehalt im Cortex und in der Medulla nach 2 — 4 Stunden erreicht. Die maximale Anreicherung bleibt über mehrere Stunden konstant. Beim Blut beginnt der Maximumwert bereits nach 2 Stunden zu fallen. Die Medulla, aus der dieses Barbiturat verhältnismässig langsam wieder ab-

gegeben wird, weist die höchste Konzentration aller Gehirnpartien auf. Beim Hund hingegen konnten Maynert und v. Dyke (8) keine spezifische Lokalisation in einem Gehirnabschnitt nach Gaben von verschiedenen Dosen von ^{15}N-Veronal feststellen.

Roth und Mitarbeiter (9) wie Titus und Weiss (10) untersuchten die Ausscheidung und den Abbau von 2—^{14}C-signierter Aethyl-methylbutyl-barbitursäure bei der Maus und beim Hund. Diese Autoren fanden u. a., dass höchstens 0,2 % der applizierten Aktivität durch die Exspirationskohlensäure ausgeschieden wurden. Man kann also annehmen, dass die Veratmung bzw. Oxydation keine oder nur eine ganz unbedeutende Rolle im Verhalten dieses Pharmakons spielt. Das scheint übrigens für die Barbiturate im allgemeinen zuzutreffen. Goldschmidt und Koss (11) fanden 0,2 % der applizierten Aktivität in der Atemluft nach Verabreichung von Phanodorm-(2—^{14}C) an Ratten. Nach Verfütterung von ^{14}C-markiertem Medomin an Ratten konnten Bernhard und Bickel (12) in der Atemluft während der gesamten Ausscheidungszeit kein radioaktives Kohlendioxyd nachweisen. Zum ähnlichen Resultat gelangten Goldschmidt und Wehr (13) nach Applikation von 2—^{14}C-markiertem Veronal.

Da die Aethyl-methylbutyl-barbitursäure im Organismus nicht oder nur zu einem ganz geringen Masse abgebaut wird, konnte für Verteilungsversuche eine Tritiumsignierung in Betracht gezogen werden.

B. Signierung der Aethyl-methylbutyl-barbitursäure

1. Methode

Die Tritierung erfolgte nach dem Austauschverfahren nach Wilzbach (3). Um eine möglichst grosse Oberfläche zu erzielen, wurde die alkoholische Lösung von Aethyl-methylbutyl-barbitursäure mit Hyflo versetzt und das Lösungsmittel abdestilliert. Das so bereitete Pulver wurde dem Tritiumgas ausgesetzt.

Für Stoffwechselversuche ist es unerlässlich, dass die austauschbaren Tritium-Atome entfernt werden, was durch mehrmaliges Auflösen des Barbiturates in Aethanol und Abdampfen des Lösungsmittels geschah; auch noch allfällig vorhandene Verunreinigungen müssen frei von Radioaktivität sein. Letztere soll ausschliesslich dem Barbiturat zukommen. Zur Überprüfung dieses Tatbestandes wurde das aktive Rohprodukt

papierchromatographisch untersucht. Die Bestimmung der Radioaktivität auf dem Papierchromatogramm erfolgte mit einem „Windowless Flow Counter Tracerlab".

2. *Experimentelles*

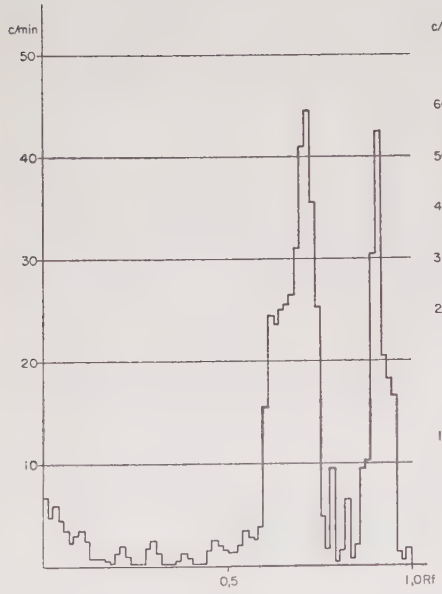
a) Signierung. 1,0 g Aethyl-methylbutyl-barbitursäure (Smp. 127—130,5 °) wurden in einem 25-ml-Rundkolben in 5 ml abs. Aethanol gelöst, dann 5 g Hyflo zugesetzt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Er blieb bei Zimmertemperatur während eines Monates in einem evakuierten Gefäss mit dem Tritiumgas (1 Curie) in Kontakt. Das Pentobarbital wurde mit Chloroform extrahiert, das Lösungsmittel auf dem Wasserbad abdestilliert. Zur Entfernung der labil gebundenen Tritium-Atome wurde die Aethyl-methylbutyl-barbitursäure dreimal in je 25 ml abs. Aethanol gelöst und je zur Trockene eingedampft und zuletzt im Hochvakuum getrocknet. Wir erhielten 0,927 g eines schwach gelblichen Pulvers vom Schmelzpunkt 127,5—131 °.

Das aktive Rohprodukt wurde als äthanolische Lösung auf Schleicher & Schüll-Papier 2043 b aufgetragen und aufsteigend mit Isopropanol-Chloroform-Ammoniak (25 %) (50:40:10) chromatographiert (14). Die Entwicklung der Chromatogramme durch Eintauchen in eine gesättigte Quecksilber-I-nitratlösung (ca. 1%ig) und anschliessendes Waschen mit dest. Wasser (14) zeigte einen Fleck mit dem Rf-Wert 0,86—0,92. Der Rf-Wert der gleichzeitig laufenden unsignierten Aethyl-methyl-butyl-barbitursäure betrug 0,85—0,89. Die Radioaktivitätsbestimmung auf dem Papierchromatogramm zeigte Aktivitätsmaxima bei Rf 0,88 und 0,98. Das Präparat enthielt zwei radioaktive Substanzen, wovon die eine praktisch frontläufig war. Um kleinere Rf-Werte und eine schärfere Trennung zu erzielen, wurde in der Folge mit einer Mischung von Chloroform-Ammoniak (10 %) (100:50) chromatographiert (15). Mit diesem Lösungsgemisch liess das Radiochromatogramm zwei deutliche Aktivitätsmaxima erkennen, bei Rf 0,72 und 0,91 und dazwischen zwei kleinere Gipfel (Fig. 1). Das entwickelte Chromatogramm zeigte hingegen nur einen Fleck bei Rf 0,72. Die Verunreinigung trat mit verschiedenen Barbiturat-Entwicklern (Quecksilbernitrat, Kobaltnitrat, Permanganat) nicht hervor.

b) Reinigung des Präparates. Das Präparat wurde an einer 10-cm-Aluminiumoxydkolonne (Aluminiumoxyd „Woelm" alkalifrei, Akt. Stufe I, mit 4 % Wasser) gereinigt. Das Rohprodukt wurde in benzolischer Lösung auf die Säule gebracht und mit je 100 ml Benzol und Benzol-Äthermischungen mit 12,5, 25 und 37,5 % Äther eluiert. Die Fraktionen wurden chromatographiert und die Radioaktivitätsverteilung bestimmt. Die erste Fraktion bestand zum grössten Teil aus der Verunreinigung. Die folgenden enthielten reines Pentobarbital. Nach dreimaliger Chromatographie erhielten wir 0,641 g radiochromatographisch reines Pentobarbital, Smp. 128—131 ° (Fig. 2).

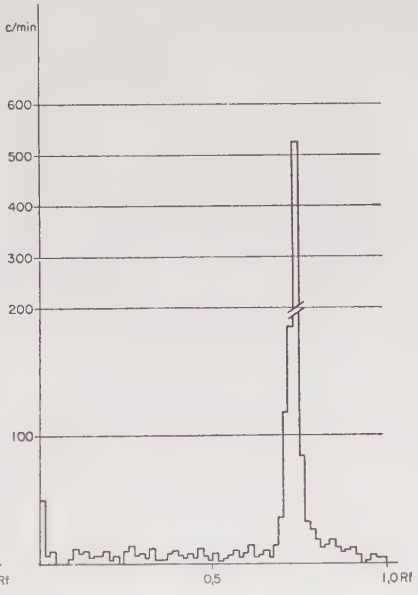
Figur 1

Chromatographische Verteilung der Radioaktivität der rohen ^{3}H-*Aethyl-methylbutyl-barbitursäure*



Figur 2

Chromatographische Verteilung der Radioaktivität der gereinigten ^{3}H-*Aethyl-methylbutyl-barbitursäure*



c) Aktivitätsmessungen. Die Aktivitätsbestimmungen aller Präparate wurden mit einem Liquid Scintillation Spectrometer Tri-Carb „Packard" bei 1200 Volt durchgeführt. Das Pentobarbital wurde in einem Lösungsgemisch folgender Zusammensetzung gemessen:

Toluol	3,0 ml
Aethanol	1,7 ml
Formamid	0,05 ml
Wasser oder H_2O_2	0,05 ml

Das Toluol enthielt im Liter 4,0 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 0,05 g 1,4-Di-[2-(5-phenyloxazol-)]benzol (POPOP). Die spezifische Aktivität betrug $7{,}91 \cdot 10^4$ c/min · mg und blieb auch für die aus ihrem Natriumsalz zurückgewonnene Säure gleich. Nach dreimaliger Umkristallisation von 10 mg ^{3}H-Pentobarbital mit 490 mg inaktivem Pentobarbital zeigten die Aktivitäten keine Unterschiede ($1{,}59 \cdot 10^3$, $1{,}57 \cdot 10^3$, $1{,}59 \cdot 10^3$ c/min · mg).

C. Verteilung und Ausscheidung

1. Methode

Verteilung und Ausscheidung von ^{3}H-signierter Aethyl-methylbutylbarbitursäure wurden an weissen Ratten untersucht. Nach peroraler Applikation des Präparates blieben die Tiere während der ganzen Dauer des Versuches in gläsernen Stoffwechselkäfigen, welche das quantitative Sammeln von Harn und Faeces erlauben.

In einem ersten Versuch von 24 Stunden Dauer wurden 25 mg appliziert. Die Gewebe zeigten eine gut messbare Aktivität, so dass wir für die folgenden Versuche die Menge auf 15 mg herabsetzten. Die Tiere gelangten in Intervallen von einigen Stunden zur Aufarbeitung. Die Lösung des getrockneten Organmaterials in Formamid erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Pearce und Mitarbeitern (16).

Die mit dem Scintillationszähler gemessenen Aktivitäten sind keine absoluten, sondern nur relative Werte, abhängig von der Zusammensetzung des Lösungsgemisches und der Spannung. Die Zählausbeute wird um so schlechter, je mehr Alkohol oder gar Wasser dem Toluol beigemischt werden. Auch eine Färbung der Zählproben verursacht einen Zählverlust, weshalb die Formamidlösungen aufgehellt werden müssen. Die

spezifische Aktivität beträgt z. B. $8{,}62 \cdot 10^4$ c/min·mg, wenn man das Formamid durch Harn ersetzt und $7{,}57 \cdot 10^4$ c/min·mg, wenn man eine Gewebslösung in Formamid anstelle von reinem Formamid verwendet. Jeder Wert ist das Mittel von 3—5 Messungen, wobei die einzelnen Werte um höchstens 2—3 % vom Mittelwert abweichen. Kontrollversuche mit inaktivem Gewebe, dem tritiertes Pentobarbital zugegeben wurde, zeigten keine Aktivitätsverluste durch Aufarbeitung und Probenherstellung.

2. Experimentelles

a) Tierversuche

Zur Verwendung gelangten männliche und weibliche weisse Ratten des Inzuchtstammes des Schweizerischen Vitamininstitutes im Gewicht von 180 bis 237 g. Für den 1-Stunden-Versuch wurden 2 Tiere, für den 24-Stunden-Versuch 3 Tiere und für die übrigen Versuche je 1 Tier eingesetzt. Für langdauernde Versuche waren 15 mg eine zu hohe, d. h. letale Dosis, welche erst nach Adaptation ertragen wurde. Zur Adaptation erhielt jedes Tier zweimal 10 mg und einmal 15 mg inaktives Pentobarbital in einem Intervall von 20—24 Stunden. 15—20 Stunden nach der letzten Gabe wurde das aktive Präparat appliziert. 6 Tiere erhielten je 15 mg auf einmal und 2 Tiere des 24-Stunden-Versuches je 25 mg ^{3}H-Pentobarbital in zwei Malen, zuerst 15 mg und 8 Stunden später, kurz nach dem Erwachen, 10 mg.

Das Pentobarbital wurde in der berechneten Menge n-NaOH gelöst und durch Verdünnen mit dest. Wasser Lösungen einer Konzentration von 10 mg/ml erhalten. Die perorale Applikation erfolgte mit der 5-ml-Injektionsspritze mit einer aufgesetzten stumpfen Kanüle, die tief in den Magen eingeführt wurde.

Da die Salzlösung dieses Barbiturates schlecht haltbar ist, wurde sie unmittelbar vor jedem Versuch frisch hergestellt. Einen aliquoten Teil verwendeten wir zur Aktivitätsbestimmung. Die Tiere wurden 1, 2, 3, 6 und 24 Stunden nach der Applikation in der Äthernarkose durch Entnahme von 6—7 ml Blut aus dem rechten Ventrikel getötet und folgende Organe herauspräpariert: Magen-Darmtractus samt Inhalt, die Leber und das Zentralnervensystem von den Riechkolben bis zur Cauda equina.

Der Rest bildete den „Carcass". Das ZNS wurde getrennt in Grosshirn (= Endhirn, Rinde und Mark-Lager), Zwischenhirn (Thalamus, Stammganglien) und einen Teil des Mittelhirnes, Kleinhirn, Nachhirn (Pons und Medulla oblongata) und hinteren Teil des Mittelhirnes, Rückenmark. Die Pia wurde möglichst entfernt.

b) Aufarbeitung des Organmaterials

1. Carcass. Den Carcass brachten wir in einen geschlossenen Kolben mit 30%iger methanolischer Kalilauge und liessen ihn bis zur Auflösung bei Zimmertemperatur stehen. Nach einigen Tagen wurde die klare Lösung von etwas ungelöstem Fett und den Knochen abfiltriert und gewogen.

2. Leber, Blut, ZNS-Abschnitte, Faeces. Das Material wurde im Vakuum-Trockenschrank bei 25° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und in einem Mörser fein pulverisiert. Je 2 Einwaagen, 10—25 mg Trockensubstanz, wurden in 2 tarierte Isomerisationsröhrchen in einer berechneten Menge reinem Formamid gelöst, so dass 0,05 ml Lösung 1,4—1,7 mg Trockensubstanz enthielten. Die mit einem Glashütchen zugedeckten Röhrchen wurden in einem Ölbad während einer Stunde auf 120° und einer Stunde auf 180° erhitzt. Die abgekühlten dunkelbraunen Lösungen wurden gewogen.

3. Magen-Darmtractus. Der gesamte, getrocknete und grob zerkleinerte Magen-Darmtractus samt Inhalt wurde in Formamid durch Erhitzen am Rückfluss im Ölbad von 120—180° gelöst. Die dunkle Lösung wurde nach Abkühlung gewogen.

c) Herstellung der Zählproben

Von jeder Lösung wurden je 0,05 ml in 2 tarierte Zählgläschen pipettiert und gewogen. Durch Zufügen von 0,05 ml Perhydrol (30%ig) und Erwärmen im Ölbad von 120° bis zum beginnenden Aufschäumen trat Aufhellung der Proben ein. Den erkalteten farblosen oder nur schwach gelblichen Lösungen wurden 1,7 ml Aethanol und 3 ml Toluol mit PPO und POPOP-Zusatz beigefügt. Es resultierten völlig klare Proben, die sich auch bei 0° in der Zählkammer nicht entmischten. Von jedem Organ,

vom Blut und von den Faeces wurden somit je 4 Zählproben hergestellt. Die spezifischen Aktivitäten, aus 3 — 5 Messungen ermittelt, stimmten gut überein. Die Abweichungen betrugen 1 — 3 %. Der Gehalt an Trockensubstanz pro Zählgläschen berechnet sich wie folgt:

$$\frac{\text{Einwaage Trockensubstanz} \times \text{Einwaage Formamidlösung}}{\text{Gesamte Formamidlösung}}$$

In analoger Weise wurden die Zählproben für die Messung der Harnaktivität hergestellt. Der gesammelte Harn, inklusive das zum Spülen der Stoffwechselkäfige verwendete Wasser, wurde nötigenfalls filtriert und gewogen. Statt Gewebslösungen wurden 0,05 ml Harnlösung verwendet, und anstelle von H_2O_2 wurden 0,05 ml dest. Wasser zugesetzt, da durch den Wasserstoffsuperoxyd keine Aufhellung erfolgte.

d) Aktivitätsbestimmung des Körperwassers

Das Körperwasser wurde durch Destillation bei 40 ° im Hochvakuum aus einem Stück Muskel von einer Hinterpfote gewonnen. Das Wasser wurde in einer gekühlten Vorlage aufgefangen.

D. Ergebnisse

Aus der Tabelle 1 ist die Verteilung in den geprüften Organen und Exkreten ersichtlich. Die Blutwerte beziehen sich nur auf die Blutmenge, welche bei der Tötung aus dem Herzen entnommen wurden. Das restliche Blut entfällt auf den Carcass. Die Versuche geben in den meisten Fällen Auskunft über das Verbleiben von mindestens 80 % der applizierten Aktivität. Tabelle 2 enthält die gemessenen spezifischen Aktivitäten der Abschnitte des Zentralnervensystems und des Blutes. Durch Multiplikation mit den entsprechenden Gewichtswerten werden die Totalaktivitäten erhalten, welche in Tabelle 3 wiedergegeben sind. Die Berechnung der Gesamtaktivität des Blutes erfolgte auf der Annahme einer totalen Blutmenge der Ratte im Ausmasse von 7 % des Körpergewichtes. Aus diesen Werten lassen sich die auf die resorbierte Aktivität bezogenen Aktivitäten in den ZNS-Abschnitten berechnen. Tabelle 4 zeigt die Verteilung im Gesamtabschnitt und Tabelle 5 die Verteilung pro mg Trocken-

substanz. Die entsprechenden Werte für das Blut und die Leber sind in Tabelle 6 wiedergegeben. Nachdem der Anteil der Faeces an der Ausscheidung nicht genau erfasst werden konnte, berechneten wir die resorbierte Aktivität aus der Differenz von applizierter Aktivität und im Magen-Darmtractus aufgefundener Aktivität. Da die Aethyl-methylbutylbarbitursäure im Organismus nicht abgebaut wird und ein Tritiumaustausch mit dem Körperwasser kaum stattfindet, worüber Tabelle 7 Auskunft gibt, lässt sich aus der gemessenen Aktivität die Pentobarbitalkonzentration in den Abschnitten des ZNS ermitteln (Fig. 3). Die Konzentrationen im Gesamthirn, im Blut und in der Leber sind aus Fig. 4 ersichtlich.

Tabelle 1

Prozentuale Verteilung der applizierten Aktivität

Tier	1	2	3	4	5	6	7	8
Std. n. Applikation	1	1	2	3	6	24	24	24
Harn	4,13	4,17	27,10	46,40	58,40	46,30	30,20	32,80
Faeces	0	0	0	0	0	21,40	5,92	9,20
Magen-Darm mit Inhalt	51,80	41,10	33,30	17,00	16,50	4,34	2,66	1,27
ZNS	0,85	0,97	0,59	0,37	0,30	0,39	0,22	0,23
Carcass	26,60	28,00	15,90	8,55	7,64	5,18	6,57	7,40
Leber	6,45	5,97	4,25	4,13	2,36	2,18	1,58	3,39
Blut	2,28	2,91	2,63	0,66	0,73	2,02	0,20	0,34
Total	92,11	83,12	83,77	77,11	85,93	81,81	47,35	54,63

Tabelle 2

Spezifische Aktivitäten der verschiedenen ZNS-Abschnitte und des Blutes (c/min · mg Trockensubstanz)

Applizierte Menge mg	15						25	
Appl. Aktivität c/min	$1{,}135 \cdot 10^6$						$1{,}892 \cdot 10^6$	
Tier	1	2	3	4	5	6	7	8
Std. n. Applikation	1	1	2	3	6	24	24	24
Grosshirn	20,5	22,8	11,5	8,65	7,07	6,9	7,3	7,4
Zwischenhirn	19,8	19,8	11,8	7,73	6,58	6,6	8,5	8,1
Kleinhirn	18,7	22,0	13,0	8,12	7,18	7,4	10,3	9,2
Nachhirn	16,6	19,7	11,3	9,20	6,10	9,0	15,3	16,4
Rückenmark	15,7	18,4	10,8	7,42	5,89	5,9	5,5	6,5
Blut	19,4	25,4	20,8	6,18	5,75	15,7	4,5	4,3

Tabelle 3

Gesamtaktivitäten der verschiedenen ZNS-Abschnitte und des Blutes (c/min)

Applizierte Menge mg	15						25	
Appl. Aktivität c/min	$1{,}135 \cdot 10^6$						$1{,}892 \cdot 10^6$	
Tier	1	2	3	4	5	6	7	8
Std. n. Applikation	1	1	2	3	6	24	24	24
Grosshirn	3 949	5 058	2 471	1 683	1 384	1 745	1 569	1 562
Zwischenhirn	1 250	1 221	745	483	437	452	351	398
Kleinhirn	1 079	1 346	753	442	426	488	586	482
Nachhirn	1 144	1 299	781	577	376	609	813	1 135
Rückenmark	2 160	2 124	1 920	985	748	1 076	855	736
Blut	48 900	63 500	58 500	24 475	17 150	43 200	13 950	15 100

Tabelle 4

Aktivitäten in % der resorbierten Aktivität

Appl. Aktivität c/min	$1{,}135 \cdot 10^6$						$1{,}892 \cdot 10^6$	
Tier	1	2	3	4	5	6	7	8
Std. n. Applikation	1	1	2	3	6	24	24	24
Grosshirn	0,724	0,758	0,326	0,179	0,146	0,160	0,085	0,084
Zwischenhirn	0,229	0,183	0,098	0,051	0,046	0,041	0,019	0,021
Kleinhirn	0,197	0,201	0,099	0,047	0,045	0,045	0,032	0,026
Nachhirn	0,209	0,194	0,103	0,061	0,040	0,056	0,044	0,061
Gehirn in toto	1,359	1,336	0,626	0,338	0,277	0,302	0,180	0,192
Rückenmark	0,395	0,319	0,254	0,105	0,079	0,099	0,047	0,039

Tabelle 5

Aktivitäten pro mg Trockensubstanz in % der resorbierten Aktivität $\times 10^3$

Appl. Aktivität c/min	$1{,}135 \cdot 10^6$						$1{,}892 \cdot 10^6$	
Tier	1	2	3	4	5	6	7	8
Versuchsdauer Std.	1	1	2	3	6	24	24	24
Grosshirn	3,77	3,43	1,52	0,92	0,75	0,64	0,40	0,40
Zwischenhirn	3,62	2,98	1,55	0,82	0,70	0,61	0,46	0,43
Kleinhirn	3,42	3,29	1,70	0,87	0,76	0,70	0,56	0,49
Nachhirn	3,04	2,90	1,49	0,97	0,65	0,83	0,83	0,88
Gehirn in toto	3,56	3,25	1,54	0,91	0,73	0,67	0,50	0,50
Rückenmark	2,87	2,76	1,42	0,79	0,62	0,54	0,30	0,35

Tabelle 6

Aktivitäten pro mg Trockensubstanz in % der resorbierten Aktivität $\times 10^3$

Appl. Aktivität c/min	$1{,}135 \cdot 10^6$						$1{,}892 \cdot 10^6$	
Tier	1	2	3	4	5	6	7	8
Std. n. Applikation	1	1	2	3	6	24	24	24
Blut	3,55	3,80	2,75	0,66	0,60	1,43	0,24	0,23
Leber	5,74	4,76	2,70	2,17	1,14	0,78	0,64	0,98

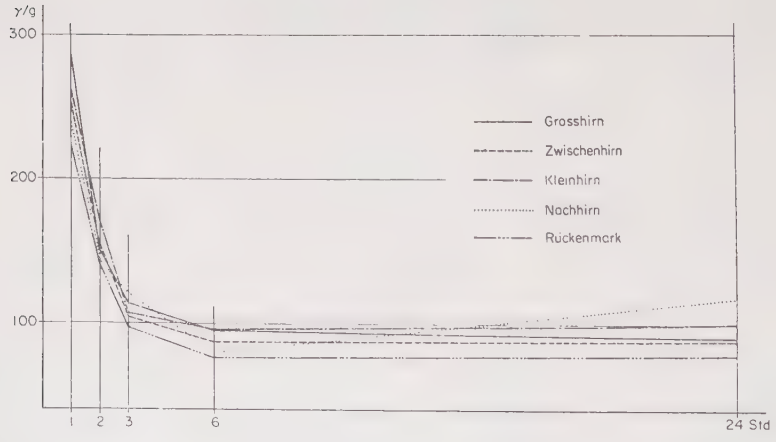
Tabelle 7

Spezifische Aktivitäten des Körperwassers nach Gaben von 15 mg (c/min · mg)

Tier	1	2	3	4	5	6
Std. nach Applikation	1	1	2	3	6	24
Spezifische Aktivität	0,29	0,30	0,40	0,15	0,09	0,07

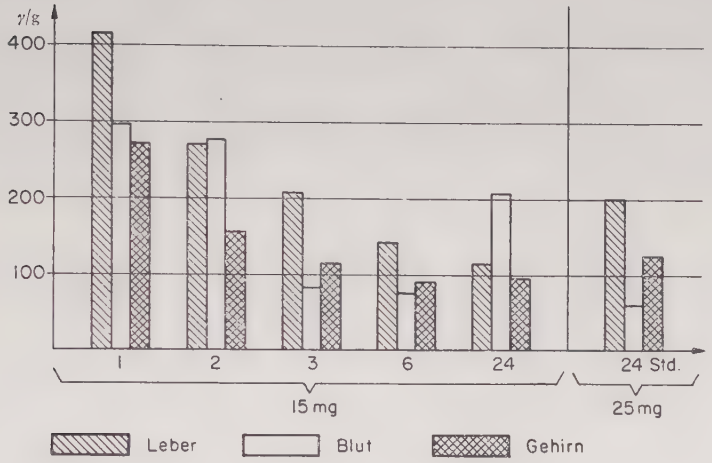
Figur 3

γ-Pentobarbital pro g Trockensubstanz des Zentralnervensystems nach Gaben von 15 mg pro Tier



Figur 4

γ-Pentobarbital pro g Trockensubstanz Leber, Blut und Gehirn nach Gaben von 15 bzw. 25 mg



E. Diskussion der Ergebnisse

Die unbefriedigende Aktivitätsbilanz der Tiere 7 und 8 ist auf einen Harnverlust zurückzuführen, indem die übrigen Werte mit denjenigen von Tier 6 übereinstimmen. Die Faeces weisen eine relativ hohe Aktivität auf, bei Tier 6 nahezu die Hälfte derjenigen des Harnes. Die Harnaktivität dieses Tieres ist niedriger als beim 3- und 6-Stunden-Versuch. Roth und Mitarbeiter (9) fanden nach 24 Stunden nur 2 % der applizierten Aktivität in den Faeces. Die hohe Faecesaktivität ist fast ausschliesslich durch Verunreinigung mit Harn bedingt. Aus der Ausscheidungskurve (Fig. 5) geht hervor, dass die biologische Halbwertszeit für die Aethyl-methylbutyl-barbitursäure 3—4 Stunden beträgt. Nach 6 Stunden sind nahezu 60 % der applizierten Aktivität ausgeschieden. Dieser Wert nimmt in den folgenden 18 Stunden nur noch um 10 % zu.

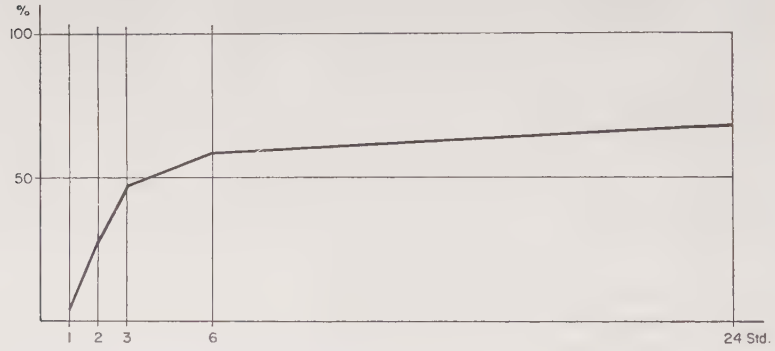
Das durch Destillation gewonnene Körperwasser weist niedrige spezifische Aktivitäten auf. Sie betragen nach einer Stunde 0,3 c/min · mg und nach 24 Stunden 0,07 c/min · mg. Ein Maximum mit 0,4 c/min · mg tritt

nach 2 Stunden auf. Im gesamten Körperwasser, das 70 % des Rattenorganismus ausmacht, findet man 1, 2 und 24 Stunden nach der Verabreichung von 15 mg Pentobarbital 3,4, 4,7 bzw. 0,8 % der applizierten Aktivität. Ein Tritiumaustausch zwischen der signierten Verbindung und der Körperflüssigkeit findet nur in geringfügigem Ausmasse statt.

Eine Stunde nach der Applikation zeigen die ZNS-Abschnitte und das Blut annähernd gleiche spezifische Aktivitäten. Nach 2 Stunden beträgt die spezifische Aktivität des Blutes nahezu das zweifache derjenigen der ZNS-Abschnitte, um in den folgenden Versuchen ständig darunter zu liegen (Ausnahme Tier 6).

Figur 5

Gesamtausscheidung in % der applizierten Aktivität nach Gaben von 15 mg



Im Verlaufe einer Stunde resorbierten Ratten das leicht wasserlösliche Natrium-Salz nur zu 48,2 resp. 58,9 %. Nach dieser Zeit erreichte die Anreicherung in den ZNS-Abschnitten bereits ein Maximum und sank nach 2 Stunden auf ungefähr die Hälfte. Im Verlaufe der nächsten Stunde nahm der Gehalt nochmals um 30 % ab. Nach 2 Stunden weist das Blut noch über 90 % und nach 3 Stunden noch rund 30 % der maximalen Konzentration auf. Der Konzentrationsabfall ist in der Leber etwas weniger steil. Die Leber weist nach 3 Stunden noch die Hälfte des nach einer Stunde vorhandenen Gehaltes auf.

Der auf Grund der gemessenen Aktivitäten berechnete Gehalt des Gehirns an Aethyl-methylbutyl-barbitursäure ist sehr klein. Das Gesamthirn weist nach einer Stunde 98 bzw. 118 γ oder 0,7 % der appli-

zierten Dosis auf. Nach 24 Stunden enthält es noch ca. 45 γ, gleichgültig, ob 15 oder 25 mg verabreicht wurden. Die Gehaltsänderung zwischen der 6. und der 24. Stunde ist minim (vgl. Tabelle 8).

Die ZNS-Abschnitte und hauptsächlich das Blut von Tier 6 weisen höhere Konzentrationen auf als bei den Tieren 7 und 8, welche sogar eine höhere Dosis Pentobarbital erhielten. Diese Diskrepanz wird wahrscheinlich durch eine verzögerte Resorption bedingt. Die Aktivität im Rückenmark ist stets die niedrigste aller ZNS-Abschnitte. Ausser beim Tier 1 ist die Konzentration im Kleinhirn durchwegs etwas grösser als im Zwischenhirn. Nach einer Stunde sind die Konzentrationen in den einzelnen

Tabelle 8

γ-Pentobarbital in Gehirn und Rückenmark

Applizierte Menge mg	15						25	
Tier	1	2	3	4	5	6	7	8
Dauer, Std.	1	1	2	3	6	24	24	24
Gehirn	98,1	117,9	72,7	42,1	34,7	43,5	43,8	47,2
Rückenmark	28,7	28,1	25,4	13,0	9,9	14,2	11,3	9,7
	pro mg Trockenorgan							
Gehirn	0,256	0,287	0,154	0,113	0,091	0,096	0,120	0,124
Rückenmark	0,206	0,243	0,142	0,098	0,077	0,078	0,073	0,086

Abschnitten des ZNS etwas unterschiedlich. Sie betragen für Nachhirn und Kleinhirn weniger als für das Grosshirn. Schon nach zwei und drei Stunden sind die Werte annähernd gleich. Nach 24 Stunden hat das Nachhirn eine höhere Konzentration als das Grosshirn. Bei den Tieren 7 und 8 beträgt sie mehr als das Doppelte. Sonst lässt sich bei den verschiedenen Versuchen keine Regelmässigkeit in der Beziehung der Konzentrationen der einzelnen Abschnitte des Gehirnes zueinander erkennen.

Isolierung und Strukturaufklärung von Metaboliten der 5-Aethyl-5-cycloheptenyl-barbitursäure

A. Allgemeines

Die ersten Untersuchungen über den Metabolismus der 5,5-Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure (Medomin) wurden schon im Jahre 1943 durch R. Pulver (17) anhand eines radioinaktiven Präparates durchgeführt. Dabei konnten aus dem Harn von Menschen etwa 11 % und aus dem Harn von Kaninchen 4,6 % 5,5-Aethyl-cycloheptenonyl-barbitursäure isoliert werden. Nachdem die unveränderte Verbindung im Harn nicht vorlag, schien dieser Befund darauf hinzuweisen, dass dieses Barbiturat zu niedrig molekularen Spaltprodukten abgebaut wird.

Die Isotopentechnik bot wiederum die Möglichkeit, die Kenntnisse über das Verhalten des Medomins zu erweitern. Unter Heranziehung der Isotopensignierung wurden die Verteilung und Ausscheidung von Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure bei der Ratte und die Ausscheidung beim Hund und beim Menschen untersucht.

Nach Verabreichung eines in Stellung 5 mit ^{14}C-markierten Präparates an Ratten konnten nach 15 Stunden 79—88 % der applizierten Aktivität im Harn aufgefunden werden. Die Exspirationskohlensäure war während der ganzen Versuchsdauer nicht aktiv. Daraus liess sich schliessen, dass kein tiefgreifender Abbau dieser Verbindung stattfindet.

Durch Papierchromatographie gelang der Nachweis von 4 Metaboliten im Harn, darunter die zwei Hauptmetaboliten I und II. Bei der Ratte und beim Hund werden rund 45 % und beim Menschen nur 15—30 % der applizierten Dosis in Form von Metabolit I ausgeschieden. Ca. 29 % werden bei der Ratte als Metabolit II eliminiert. Nach wiederholten Gaben von Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure an Hunde konnten die Metaboliten I und II aus dem angesäuerten Harn mit Äther extrahiert werden. Bei Zusatz von Wasser zur äthanolischen Extraktlösung kristallisierte gelbbraunes Material aus, das nach Behandlung mit Tierkohle aus Wasser/Alkohol farblose Kristalle vom Schmelzpunkt 214—217° gab. Ihr Rf-Wert war mit dem von Metabolit I identisch, sie erwiesen sich papierchromatographisch rein. Das IR-Spektrum zeigte das Vorliegen

eines Barbitursäurederivates mit neuen Banden, wobei es sich um C = O- und C = C-Valenzschwingungen handeln dürfte. Eine weitere Bande lässt eine OH-Valenzschwingung vermuten. Mikroanalyse und Spektren legten für die Konstitution von Metabolit I eine im 7-Ring oxydierte Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure nahe. Der Nachweis einer OH-Gruppe durch Veresterung gelang nicht. Nach dem Acetylierungsprozess zeigte der Metabolit I fast unveränderte Eigenschaften. Der Nachweis der Carbonylgruppe konnte mit Semicarbazid erbracht werden. Daraus ergab sich, dass der Metabolit I, 5-Aethyl-5-(oxo-cycloheptenyl-)barbitursäure, mit dem von Pulver (17) isolierten Metaboliten identisch war (18).

Die Isolierung von Metabolit II aus dem Ätherextrakt und die Abtrennung von nicht auskristallisierbarem Metaboliten I erwiesen sich als langwierig. Zahlreiche Bemühungen (fraktionierte Auskristallisation mit verschiedenen Solventien, Gegenstromverteilung, präparative Papierchromatographie) führten nicht zu einer genügenden Menge von reinem Metaboliten II, um dessen Struktur aufzuklären.

Zur weiteren Trennung wurde die in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewinnende Chromatographie an dünnen Schichten nach Stahl verwendet (19). Der ätherische Harnextrakt wurde an Silikagel mit abs. Äther, 1,5 % Eisessig enthaltend, chromatographiert. Durch Entwicklung der Chromatogramme mit saurer Permanganatlösung traten 3 Flecken hervor. Die polarste dieser drei Substanzen (Rf 0,60) entsprach der auf dem Papierchromatogramm als Metabolit II bezeichneten Substanz. Hingegen ergab sich eine Auftrennung des papierchromatographisch reinen und als homogene Substanz betrachteten Metaboliten I in zwei Komponenten, Substanz Ia (Rf 0,85) und Substanz Ib (Rf 0,73).

Diese Ergebnisse wurden auf eine Silikagelsäule übertragen.

B. Isolierung und Identifizierung der Metaboliten

1. Methode

Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure wurde während mehreren Tagen einem Hunde verabreicht, der gesammelte Harn nach Ansäuern mit Äther extrahiert und der eingeengte dunkelbraune Ätherextrakt auf eine Silikagelsäule gebracht. Die Kolonne wurde mit einem Fraktionensammler verbunden. Als Elutionsmittel diente eine Mischung von abs. Äther und

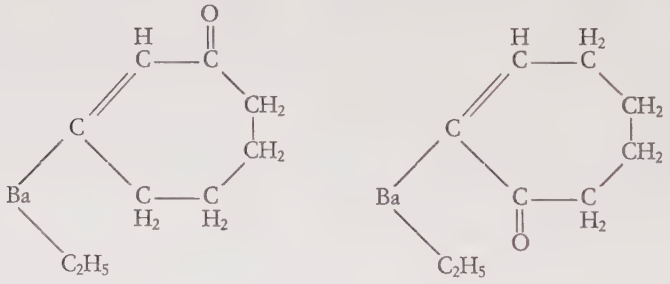
Eisessig. Die Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie auf ihre Reinheit geprüft. Durch Wiederholung der chromatographischen Trennung konnten aus den Mischfraktionen weitere reine Fraktionen erhalten werden. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurden die Rohmetaboliten Ia, Ib und II umkristallisiert.

2. Identifizierung der Metaboliten Ia und Ib

Metabolit Ia schmilzt nach Umkristallisation aus Methanol/Wasser bei 224° und erwies sich durch Elementaranalyse und durch das Hydrazon mit der von Pulver (17) und Bickel (18) für Metabolit I aufgestellten Formel identisch:

$C_{13}H_{16}N_2O_4$	Ber.	C 59,08	H 6,10	N 10,60
	Gef.	C 59,04	H 6,02	N 10,42

Dieser Metabolit, 5-Aethyl-5-(oxo-cycloheptenyl-)barbitursäure, weist eine konjugierte Doppelbindung auf. Dadurch ergeben sich zwei mögliche Strukturen mit der Carbonylgruppe in Stellung 3′ oder in Stellung 7′:



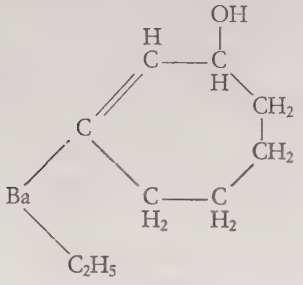
(Ba = Barbitursäure)

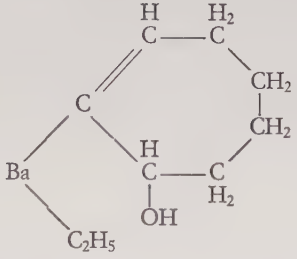
Einen weiteren Beweis für die richtige Formulierung liefert die Oxydation von Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure zum Metaboliten Ia mit tertiärem Butylchromat, einem Reagens zur Einführung einer Keto-Gruppe in α-Stellung zu einer Doppelbindung.

Metabolit Ib schmilzt nach Umkristallisation aus Wasser bei 184° und ist ebenfalls eine im Heptenylring oxydierte Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure durch Einführung einer Hydroxylgruppe, die durch Acetylierung und Mikroanalyse nachgewiesen wurde:

$C_{13}H_{18}N_2O_4$	Ber.	C 58,63	H 6,81	N 10,52
	Gef.	C 58,76	H 6,81	N 10,30

Dieser Metabolit, 5-Aethyl-5-(hydroxy-cycloheptenyl-)barbitursäure, kann aus Ia durch Reduktion nach Meerwein-Ponndorf synthetisiert werden; die Oxydation mit Kalium-dichromat nach Beckman liefert den Metaboliten Ia. Da sich beide Metaboliten ineinander überführen lassen, kommen für den Metaboliten Ib wiederum zwei Strukturen in Betracht:





Die Strukturaufklärung dieser Metaboliten erfolgte mit Hilfe einer im Heptenylring mit ^{14}C-signierter Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure.

3. Identifizierung von Metabolit II

Zur Konstitutionsaufklärung von Metabolit II stand uns nach Verfütterung von unsignierter und markierter Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure erhaltenes Material zur Verfügung. Die mikroskopische Verfolgung des Schmelzvorganges des aus Essigester/Pentan umkristallisierten Metaboliten liess erkennen, dass ein Teil bei 160°, ein anderer Teil aber erst bei ca. 190° schmolz, also ein Gemisch vorlag. Zur Reinigung wurden verschiedene Wege beschritten. Weder durch Säulenchromatographie an Silikagel oder Alox noch durch Dünnschichtchromatographie liess sich das Gemisch in seine Komponenten auftrennen. Die mit verschiedenen neutralen, sauren oder alkalischen Lösungsmitteln entwickelten Chromatogramme zeigten nach Besprühen mit Kaliumpermanganat, Cobaltnitrat, Universalindikator oder Schwefelsäure immer nur einen Fleck. Auch die fraktionierte Umkristallisation aus verschiedenen Solventien führte zu keinem befriedigenden Resultat. Es konnte zwar eine reinere Fraktion vom Schmelzpunkt 188—192° aus Essigester/Äther isoliert werden, die mit Cobaltnitrat eine positive Barbituratreaktion gab. Die übrigen Fraktionen zeigten alle einen sehr unscharfen Schmelzpunkt und eine mehr oder weniger starke Barbituratreaktion.

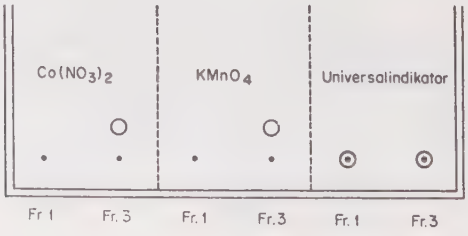
Die bei 188—192° schmelzende Fraktion wurde zur weiteren Reinigung als 1,3-Dimethylderivat gaschromatographiert, das durch Umsetzung mit Diazomethan erhalten wurde (20—22). Das erhaltene Chromatogramm wies neben dem Lösungsmittelpeak nur einen peak auf. Die Retentionszeit war nur wenig länger als für die Metaboliten Ia und Ib. Die Elementaranalysen der aufgefangenen Fraktion und des unmethylierten Metaboliten (Smp. 188—192°) lieferten folgende Werte, die am nächsten derjenigen eines Derivates der Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure mit einer zusätzlichen OH-Gruppe (Alkohol) bzw. dessen dimethylierten Produktes liegen:

Alkohol	Ber.	C 58,63	H 6,81	N	10,52
$C_{13}H_{18}N_2O_4$	Gef.	C 58,91	H 7,00	N	9,99
Alkohol dimethyl.	Ber.	C 61,20	H 7,53	N	9,52
$C_{15}H_{22}N_2O_4$	Gef.	C 61,02	H 7,46	N	— —

Da die Gewinnung von reinem Metaboliten aus inaktivem Ausgangsmaterial scheiterte, wurde mit dem markierten Material weiter gearbeitet. Dabei zeigte sich, dass die beiden rohen Metabolitfraktionen verschieden verunreinigt waren. Der signierte Rohmetabolit, Smp. 140—190°, wurde aus Essigester/Pentan umkristallisiert. Dabei erhielten wir folgende 3 Fraktionen:

1. Fraktion: Smp. 140—145°, radioinaktiv, negative Barbituratreaktion mit Cobaltnitrat;
2. Fraktion: Smp. 140—148°, radioinaktiv, negative Barbituratreaktion;
3. Fraktion: Smp. 190—192°, mit wenig bei 140° schmelzender Verunreinigung, radioaktiv, positive Barbituratreaktion.

Die Verunreinigung liess sich plattenchromatographisch abtrennen. Die Chromatogramme wurden mit Äther-Hexan entwickelt und mit $KMnO_4$, $Co(NO_3)_2$ oder alkalischem Universalindikator besprüht. Dabei betrug der Rf-Wert des Metaboliten 0,135, während die Verunreinigung am Startpunkt blieb.



Da nur einige Milligramme der Fraktion 3 vorhanden waren, wurden sie an einer Silikagelplatte chromatographiert. Der so gereinigte und umkristallisierte Metabolit II wies einen Smp. von 188—192° auf.

Im *UV* zeigte der Metabolit II die für Barbiturate charakteristische Bande bei 239 mμ in 0,01 n NaOH, die in saurem Medium verschwindet. Aus dem Verlauf der Absorptionskurve im fernen UV (187—220 mμ) in 0,01 n HCl kann geschlossen werden, dass Metabolit II die isolierte Doppelbindung des Heptenylringes noch enthält. Die Absorption der Metaboliten Ib und II sowie der Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure sind in diesem Bereich praktisch identisch und stärker als diejenige von Diäthylbarbitursäure. Die Differenz entspricht einer zusätzlichen Absorption mit einem Maximum bei 197 mμ, was mit einer isolierten Doppelbindung verträglich ist.

Das *IR-Spektrum* von Metabolit II in KBr weist mit demjenigen von Ib eine grosse Ähnlichkeit auf und zeigt primär das Vorliegen eines Barbitursäurederivates mit Banden bei 3,13 und 3,26 μ (N—H, zwischenmolekular assoziiert), 5,76 μ (Schulter) und 5,87 μ (C=O). Ferner tritt eine Bande bei 2,86 μ auf, die für OH-Valenzschwingungen charakteristisch ist. In CH_2Cl_2 (ca. 0,04 %, 1 cm Schicht und NaCl/Gitter) ist eine Bande bei 2,77 μ zu erkennen, die von freiem O—H herzurühren scheint; daneben tritt die N—H-Absorption bei 2,96 μ auf.

Diese Daten deuten darauf hin, dass es sich beim Metaboliten II um eine dem Metaboliten Ib sehr ähnliche Verbindung handelt.

4. Experimentelles

a) Gaschromatographische Reinigung von inaktivem Metabolit II. 8 mg Metabolit II (Smp. 188—192°) wurden mit einem Überschuss an Diazomethan versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Lösungsmittel wurde unter Stickstoffbegasung eliminiert und ein Teil des dickviskösen Rückstandes nach Verdünnen mit einem Tropfen Pyridin in die Kolonne injiziert.

Die Trennung erfolgte in einem Beckman/GC-2-Gaschromatographen bei 190°, welcher das Auffangen einzelner Fraktionen erlaubt. Als stationäre Phase verwendeten wir 5 % GE-Silicone Elastomer SE-30 auf Hyflo-Supercell (60—80 mesh).

Nach zweimaliger Auftrennung wurden insgesamt 3,3 mg zähflüssiges Methylierungsprodukt erhalten.

b) Plattenchromatographische Reinigung von markiertem Metabolit II. 4—5 mg der 3. Fraktion wurden in 2 Tropfen Methanol gelöst und über die ganze Plattenbreite aufgetragen. Das mit getrocknetem Äther-Hexan (5:1) entwickelte Chromatogramm wurde an den Rändern mit Kaliumpermanganat besprüht. Der metabolithaltige Streifen wurde abgekratzt und der Metabolit mit Methanol herausgelöst. Aus Essigester/Pentan umkristallisiert, erhielten wir 1,7 mg Metabolit II (Smp. 188—192°).

C. Strukturaufklärung der Metaboliten Ia und Ib

1. Allgemeines

In früheren Arbeiten über den Stoffwechsel der Barbiturate konnten auftretende Metaboliten strukturell nicht aufgeklärt werden. Pulver nahm an, dass sich die Carbonylgruppe im Metaboliten Ia in Stellung 3′ befindet. Fretwurst und Mitarbeiter (23) fanden, dass die Aethyl-cyclohexenyl-barbitursäure (Phanodorm) durch Einführung einer Ketogruppe im Cyclohexenring als Aethyl-cyclohexenonyl-barbitursäure ausgeschieden wird. Auch Evipan (1,5-Dimethyl-5-cyclohexenyl-barbitursäure) wird nach Untersuchungen von Bush und Mitarbeitern (24) als ähnliches Oxydationsprodukt eliminiert. In keinem dieser Fälle wurde die Stellung der Carbonylgruppe festgelegt.

Nach Gaben von Phanodorm an Kaninchen wiesen Tsukamoto und Mitarbeiter (25, 26) 5-Aethyl-5-(oxo-Δ'-cyclohexenyl-)barbitursäure im Harn nach. Dieser Metabolit erwies sich mit dem Oxydationsprodukt von Phanodorm mit Chromoxyd identisch. Die eingeführte Carbonylgruppe befindet sich zur Doppelbindung α-ständig in Stellung 3′ oder 6′. Um die Position der Ketogruppe festzulegen, wurde der Metabolit durch Aromatisierung in 5-Aethyl-5-hydroxy-phenyl-barbitursäure übergeführt und weiter zu m-Oxybenzoesäure abgebaut. m-Oxybenzoesäure wird dabei gebildet, wenn sich die ursprüngliche Ketogruppe in Stellung 3′ oder 5′ befindet. Auf diese Weise konnten Position 6′ und 5′ ausgeschlossen werden. Aus m-Methoxybenzaldehyd wurde die 5-Aethyl-5-(3-methoxy-phenyl-)barbitursäure synthetisiert und zu 5-Aethyl-5-(3-hydroxy-phenyl-) barbitursäure demethyliert. Die durch Aromatisierung des Metaboliten bzw. durch Synthese gewonnenen Barbitursäuren waren identisch; die Carbonylgruppe befand sich also in Position 3′.

Analog wurde die Struktur eines Metaboliten der 1,5-Dimethyl-5-cyclohexenyl-barbitursäure aufgeklärt (27). Nachdem der Phanodorm-Metabolit in m-Oxybenzoesäure übergeführt werden kann, haben Goldschmidt und Koss (11) zur Unterscheidung der beiden möglichen Isomeren (OH in Position 3′ oder 5′) den Metaboliten der Ozonolyse unterworfen. Als Abbauprodukt erhielten sie Glutarsäure, die nur entsteht, wenn sich die Carbonylgruppe in α-Stellung zur Doppelbindung, also in Position 3′ oder 6′ befindet. Damit liess sich die 5′-Stellung endgültig ausschliessen.

Zur Strukturaufklärung der Metaboliten der Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure haben wir unter Heranziehung der Isotopensignierung einen neuen Weg beschritten.

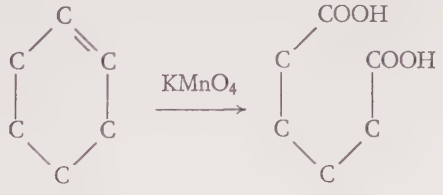
2. Theoretischer Teil

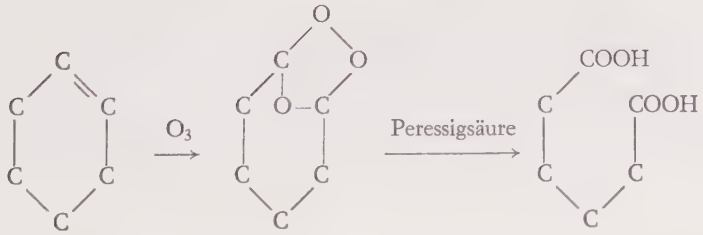
Die Einwirkung von Permanganat auf die gegen Oxydationsmittel empfindliche C=C-Doppelbindung von Olefinen führt über das primär gebildete Glykol zu Carbonsäuren oder Ketonen je nach den Substituenten der an der Doppelbindung beteiligten Kohlenstoffatome:

$$R-CH=CH-R' \xrightarrow{4\,O} R-COOH+HOOC-R'$$

Durch Anlagerung von Ozon an die Doppelbindung und durch hydrolytische Spaltung des Ozonids bilden sich zwei Moleküle Aldehyd oder Keton.

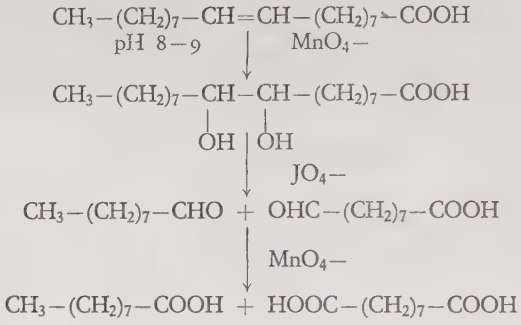
Durch Oxydation von Cycloolefinen mit Permanganat findet unter Bildung einer Dicarbonsäure eine Spaltung der Doppelbindung statt. Zum gleichen Ziel führt die oxydative Spaltung mit Ozon und Peressigsäure:



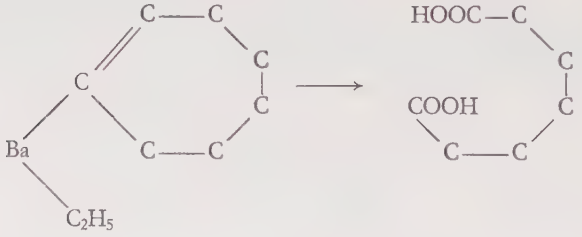


Neben den erwähnten Abbauprodukten entstehen aber noch niedrigere Degradationsprodukte.

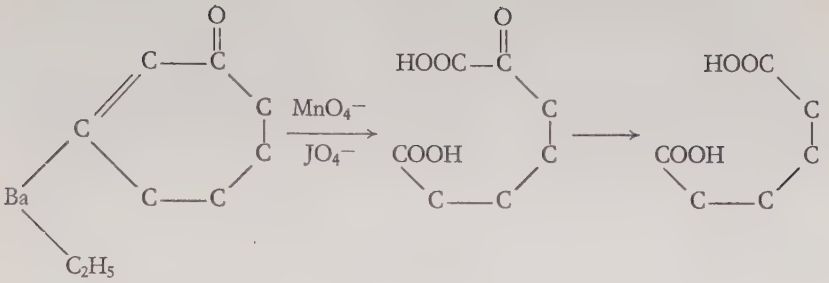
Eine quantitative Spaltung von Olefinen ohne weiteren Abbau derselben ist mit Perjodat und Permanganat möglich. Rudloff (28) erhielt aus Ölsäure mit verdünnter Natriumperjodatlösung und mit katalytischen Mengen von Kaliumpermanganat Pelargon- und Azelainsäure in quantitativer Ausbeute:

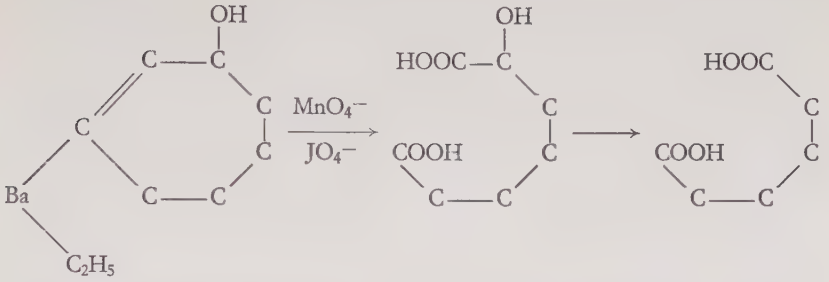


Wir verwendeten dieses Verfahren für den Abbau der Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure und der Metaboliten Ia und Ib. Als Degradationsprodukt der Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure konnte eine C_7-Dicarbonsäure, Pimelinsäure, isoliert werden:

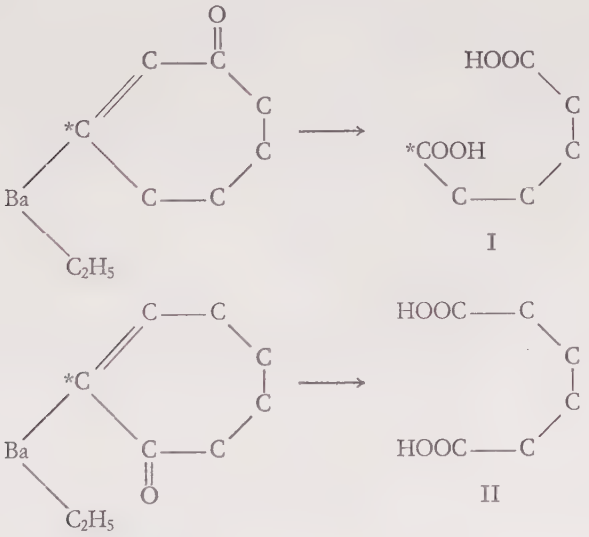


Die Oxydation der Metaboliten Ia und Ib liefert hingegen Adipinsäure. Die durch die Oxydationsmittel bedingte Ringöffnung führt beim Metaboliten Ia zu einer α-Ketodicarbonsäure und beim Metaboliten Ib zu einer α-Oxydicarbonsäure. Durch weitere Oxydation gehen beide unter CO_2-Abspaltung in die um ein Kohlenstoffatom ärmere Dicarbonsäure über:





Je nach Stellung der Keto- oder Oxygruppe in bezug auf die Bindung Barbitursäure—Heptenylring wird ein anderes Kohlenstoffatom abgespalten:



Um festzustellen, welches Kohlenstoffatom abgespalten wird, d. h. also die Stellung der Carbonyl- und Oxygruppe zu bestimmen, wurde eine im Heptenylring mit ^{14}C in Stellung 1′ spezifisch markierte Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure synthetisiert. Der oxydative Abbau der nach Verfütterung erhaltenen Metaboliten muss entweder zu radioaktiver (I) oder inaktiver Adipinsäure (II) führen.

D. Synthese von ^{14}C-signierter 5-Aethyl-5-cycloheptenyl-barbitursäure

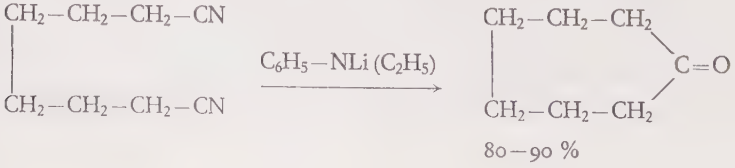
Um eine genügende Menge der Metaboliten aus dem Harn zu erhalten, musste eine relativ grosse Menge des signierten Präparates verfüttert werden. Seine spezifische Aktivität brauchte aber nicht beträchtlich zu sein. Aus Vorversuchen mit inaktivem Material ergab sich eine Totalausbeute von ca. 20 %. Mit einem Ansatz von 0,2 Mol liessen sich ca. 10 g Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure gewinnen. Setzt man 0,1 mc ein, so beträgt die spezifische Aktivität ca. $2 \cdot 10^3$ c/min · mg, ist also für unsere Zwecke hinreichend.

1. Theoretischer Teil

Die Herstellung des Barbiturates erfolgte nach der von Bickel (18) verwendeten Methode für die Synthese von Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure-(5-^{14}C), ausgehend von Cyanessigsäuremethylester und Cycloheptanon.

a) Herstellung von signiertem Cycloheptanon

Wir stellten ein am Carbonyl signiertes Cycloheptanon durch Nitrilcyclisation in hoher Verdünnung nach Ziegler (29—31) dar.

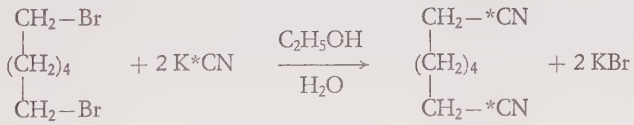


Dieses Verfahren geht vom leicht zugänglichen Korksäuredinitril aus und liefert in hoher Ausbeute Cycloheptanon. Das Verdünnungsprinzip beruht darauf, dass man das zu cyclisierende Material allmählich in den Reaktionsraum eintropfen lässt, in dem die für den Eintritt der Cyclisation notwendigen Bedingungen herrschen. Dadurch wird an Stelle der intermolekularen Verkettung der Enden der Moleküle, d. h. der Kettenverlängerung, die Ringbildung durch eine intramolekulare Verknüpfung der Enden des kettenförmigen Moleküls bevorzugt. Die Nitrilcyclisation verläuft sehr glatt; bei der Durchführung in hoher Verdünnung erfolgen keinerlei Ausweichreaktionen, sondern im wesentlichen nur Ringbildungen. Als Lösungsmittel wird vorzugsweise Diäthyläther verwendet, aber auch Di-iso-propyl- und Di-n-propyläther sind geeignet. Als Kondensationsmittel dienen am besten Natriummethyl-anilin und Lithiumäthyl-anilin in möglichst hoher Konzentration. Da diese Kondensationsmittel sehr luftempfindlich sind, muss stets unter Stickstoff gearbeitet werden. Ein Nachteil bei der Herstellung eines signierten Ketons auf diesem Wege ist der Aktivitätsverlust. Durch Hydrolyse des intermediär gebildeten Cyanketimids wird die Hälfte der eingesetzten Aktivität als aktives CO_2 abgespalten.

Für die Gewinnung von ^{14}C-carbonylsigniertem Cycloheptanon wurde von markiertem Korksäuredinitril ausgegangen, welches durch Umsetzung von 1,6-Dibromhexan mit ^{14}C-signiertem Kaliumcyanid gewonnen wurde.

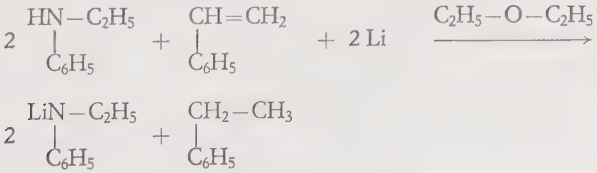
Die radioaktive Synthese von Cycloheptanon lässt sich folgendermassen formulieren:

Stufe I:

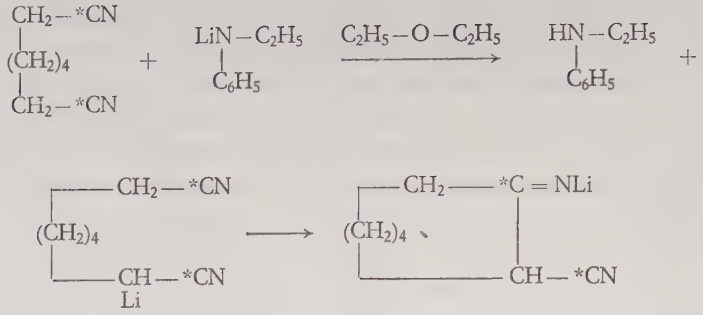


Stufe II:

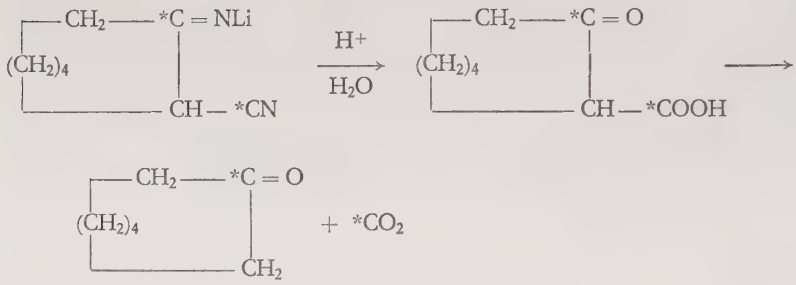
a) Herstellung des Kondensationsmittels



β) Cyclisierung



γ) Verseifung



b) Herstellung von 5-Aethyl-5-cycloheptenyl-barbitursäure

Die Barbituratsynthese bot keine besonderen Schwierigkeiten. Das von Bickel (18) angegebene Verfahren für einen 0,01-Mol-Ansatz konnte mit wenig Änderungen für den 0,1 – 0,2-Mol-Ansatz verwendet werden.

2. Experimentelles

a) Modellversuche mit inaktivem Material

aa) Cycloheptanon. Die Dinitrilherstellung aus 1,6-Dibromhexan mit Kaliumcyanid bot bei einer Ausbeute von 82 % keine Schwierigkeiten. Zur Herstellung von Lithiumäthylanilin wurde das Lithium mit dem Aethylanilin in Anwesenheit von Styrol unter verschiedenen Bedingungen zur Reaktion gebracht. Das Lithium muss eine möglichst grosse Oberfläche

aufweisen, um möglichst quantitativ umgesetzt zu werden. Das Lösungsmittel muss absolut wasserfrei sein und die Luft aus der Apparatur verdrängt werden. Versuche zur Herstellung von Lithiumäthylanilin über Lithiumbutyl blieben erfolglos (32, 33). Es wurde eine 1,5 molare Lithiumäthylanilinlösung mit 25 % Aethylanilinüberschuss verwendet. Die Verseifung des Cyanketimids verlief glatt und die Wasserdampfdestillation lieferte reines Cycloheptanon. Die Ausbeute konnte auf 87 % gesteigert werden.

ab) 5-Aethyl-5-cycloheptenyl-barbitursäure. Die Vorschrift erlaubte ohne Vorversuche eine Totalsynthese durchzuführen, wobei eine genügende Ausbeute von 28 % erzielt werden konnte.

b) Synthese von 5-Aethyl-5-cycloheptenyl-(1′-^{14}C-)barbitursäure

Die Synthese wurde in 0,2 molarem Ansatz ausgeführt.

ba) Cycloheptanon-(carbonyl-^{14}C)

Herstellung von Korksäuredinitril

Ansatz:	48,8 g	1,6-Dibromhexan
	15,2 mg	KCN-(^{14}C) (0,1 mc)
	26,03 g	KCN
	30 ml	Wasser
	132 ml	Aethanol
Apparatur:	500-ml-Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Tropftrichter	

Das Kaliumcyanid wurde im Kolben mit dem Wasser versetzt und zur völligen Lösung später 10 Minuten am Rückfluss erhitzt. In die heisse Lösung wurde die Lösung von Dibromhexan in Aethanol während 50 Minuten zugetropft. Die dunkelbraune Mischung wurde während 40 Stunden am Rückfluss gekocht, wobei Ausscheidung eines weissen kristallinen Niederschlages auftrat. Nach Abkühlung wurde die Lösung abdekantiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Reaktionsniederschlag (KBr) und der Destillationsrückstand wurden in 110 ml Wasser aufgenommen. Die organische Phase wurde im Scheidetrichter abgetrennt und die wässerige Phase viermal mit je 60 ml Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherauszüge und die organische Phase wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Die klare Lösung wurde auf dem Wasserbad vom Äther befreit und der Rückstand der fraktionierten Vakuumdestillation unterworfen. Es wurden 24,68 g farbloses Korksäuredinitril

vom Siedepunkt 165—168° (11—12 mm Hg) gewonnen. Dies entspricht einer Ausbeute von 90,5 %.

Nitrilcyclisierung in hoher Verdünnung

Ansatz:	113,6	g	Aethylanilin
	39,0	g	Styrol
	5,25	g	Lithium
	24,68	g	Korksäuredinitril
	500	ml	Äther abs.

Apparatur: 1 l-Dreihalskolben mit Rührer
Rückflusskühler
Tropftrichter (mit $CaCl_2$-Röhrchen)
N_2-Einleitung

α) Herstellung von 500 ml einer 1,5-mol.-Lithiumäthylanilin-Lösung: Im Kolben wurden der abs. Äther und das Styrol gemischt und die Apparatur mit getrocknetem Stickstoff (durch H_2SO_4 konz., $CaCl_2$ und Phosphorpentoxyd geleitet) durchflutet. Dann wurde unter Paraffinöl zu dünnen Plättchen gestanztes Lithium zugegeben und das Aethylanilin während 20 Minuten zugetropft. Anfänglich löste sich das Lithium unter heftiger Wärmetönung; gegen Ende wurde auf dem Wasserbad erwärmt. Nach 3 Stunden war alles bis auf einen minimen Rest gelöst. Während der ganzen Zeit wurde mit Stickstoff begast.

β) Cyclisierung: Unter andauernder Stickstoffbegasung wurde zum siedenden Kondensationsmittel die Lösung von Korksäuredinitril in 50 ml abs. Äther während zweieinhalb Stunden zugetropft. Anschliessend wurde noch 90 Minuten am Rückfluss gekocht, dann unter Kühlung das Reaktionsgemisch mit 200 ml Wasser versetzt. Nach Abtrennung der organischen Phase wurde die wässerige Phase einmal mit 100 ml und einmal mit 75 ml Äther ausgezogen. Die organische Phase und die Ätherauszüge wurden über Na_2SO_4 getrocknet und der Äther abdestilliert. Die Nebenprodukte wurden durch Vakuumdestillation entfernt. Der Destillationsrückstand, Cyanketimid war fest und gelbbraun.

γ) Verseifung und Isolierung

Apparatur: 500-ml-Rundkolben mit
I. Rückflusskühler und
II. Destillationsaufsatz

Das Cyanketimid wurde in einer Mischung von 120 ml konz. H_2SO_4 und 330 ml Wasser gelöst und während 5 Stunden im Ölbad am Rückfluss

zum Sieden erhitzt. Darauf wurde der Kolben mit einem Destillationsaufsatz verbunden und Cycloheptanon mit dem Wasserdampf überdestilliert. Nach zweieinhalb Stunden wurde erneut Wasser zugesetzt und noch während 9 Stunden weiter destilliert. Das Destillat wurde bei pH 8—9 dreimal mit 50 ml Äther ausgeschüttelt und die über Na_2SO_4 getrockneten Ätherauszüge eingedampft. Wir erhielten 14,97 g gaschromatographisch reines Cycloheptanon. Die Ausbeute betrug 73,5 %.

bb) 5-Aethyl-5-cycloheptenyl-(1′-^{14}C-)barbitursäure

Herstellung von Cycloheptenyl-cyanessigsäure-methylester

Ansatz: 14,90 g Cycloheptanon
15,10 g Cyanessigsäuremethylester dest.
9,54 g Eisessig dest.
2,60 g Acetamid

Apparatur: 250-ml-Dreihalskolben mit Rührer
Rückflusskühler

Der Ansatz wurde bis zur klaren Lösung während 45 Minuten bei Zimmertemperatur gerührt und über Nacht stehengelassen. Nach Zugabe von 40 ml reinem Benzol wurde während 4½ Stunden am Rückfluss gekocht. Beim anschliessenden Destillationsprozess zur Entfernung von Lösungsmittel und Reaktionswasser wurde der Kolben tief ins Ölbad getaucht und wie folgt vorgegangen:

Zugabe von 40 ml Benzol — 2 Stunden bei 145°
Zugabe von 40 ml Benzol — 1 Stunde bei 160°
Destillationsdauer: 4½ Stunden — 1½ Stunden bei 160°

Den dunkelbraunen Destillationsrückstand verdünnten wir nach dem Erkalten mit 60 ml Benzol und schüttelten im Scheidetrichter:

2mal mit 100 ml Wasser
1mal mit 60 ml gesättigter Na_2CO_3-Lösung
2mal mit 100 ml Wasser (bis neutrale Reaktion des Waschwassers)

Die vereinigten Waschwasser wurden zweimal mit je 100 ml und einmal mit 60 ml Benzol ausgeschüttelt, die Benzolfraktionen vereinigt und

über Na_2SO_4 getrocknet. Das Benzol wurde auf dem Wasserbad unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand einer fraktionierten Vakuumdestillation unterworfen. Wir erhielten 18,87 g leicht gelblichen Cycloheptenyl-cyanessigsäuremethylester vom Siedepunkt 154 bis 156° (11—12 mm Hg) entsprechend einer Ausbeute von 73 %.

Herstellung von Aethyl-cycloheptenyl-cyanessigsäure-methylester

Ansatz:	18,87 g	Cycloheptenyl-cyanessigsäuremethylester
	21,30 g	Aethyljodid
	2,24 g	Natrium
	31,5 ml	Methanol super-abs.
Apparatur:	250-ml-Dreihalskolben mit Rührer	
	Rückflusskühler	
	Tropftrichter mit $CaCl_2$-Röhrchen	

Das Natrium wurde in Methanol gelöst, die Alkoholat-Lösung auf 60° erwärmt und innert einer Minute Cycloheptenyl-cyanessigsäuremethylester zugetropft. Die Mischung verfärbte sich orange. Das Aethyljodid wurde während 1 Stunde und 40 Minuten zugetropft; am Schluss wurden noch weitere 3,0 g zugesetzt. Der Ansatz wurde über Nacht im Ölbad bei 70—75° weiter gerührt. Nach ca. 15 Stunden reagierte das Gemisch nicht mehr alkalisch gegen Phenolphthalein (pH 7—8). Methanol und Aethyljodid wurden zuerst auf dem Wasserbad, dann unter Vakuum abdestilliert. Zur Abtrennung des NaJ wurde der salzige Rückstand in 100 ml Wasser und 100 ml Äther aufgenommen, die wässerige Phase abgetrennt. Die wässerige Phase wurde fünfmal mit je 100 ml Äther ausgeschüttelt, die Ätherfraktionen vereinigt und getrocknet. Die klare Lösung wurde auf dem Wasserbad vom Äther befreit. Fraktionierte Vakuumdestillation des Rückstandes. Wir gewannen 18,34 g leicht gelblichen Aethyl-cycloheptenyl-cyanessigsäuremethylester vom Siedepunkt 155—156° (11—12 mm Hg). Die Ausbeute betrug 85 %.

Herstellung von Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure

Ansatz:	18,34 g	Aethyl-cycloheptenyl-cyanessigsäure-methylester
	7,67 g	Cyanguanidin
	1,91 g	Natrium
	170 ml	Methanol super-abs.
Apparatur:	500-ml-Dreihalskolben mit Rührer	
	Rückflusskühler	
	Tropftrichter mit $CaCl_2$-Röhrchen	

Das fein gepulverte, während 48 Stunden bei 100° getrocknete Cyanguanidin wurde in der Alkoholat-Lösung bei Zimmertemperatur fast vollständig gelöst und der Aethyl-cycloheptenyl-cyanessigsäuremethylester verdünnt mit 10 ml Methanol zugegeben. Zuerst wurde eine Stunde bei 20°, dann über Nacht (14 Stunden) bei einer Ölbadtemperatur von 80° gerührt. Im Verlauf der Reaktion wurden, um verdampftes Lösungsmittel zu ersetzen, ca. 30 ml Methanol zugegeben. Die Verseifung erfolgte nach dem Erkalten unter Kühlung und schnellem Rühren mit 170 ml konz. HCl, die während 40 Minuten zugetropft wurden. Dabei schied sich ein feiner Niederschlag aus. Durch Kochen am Rückfluss im Ölbad von 90 bis 95° während 2 Stunden wurde die Verseifung zu Ende geführt. Es entstand eine klare Lösung, aus welcher beim Abkühlen ein Niederschlag auskristallisierte. Das Methanol wurde auf dem Wasserbad unter vermindertem Druck abdestilliert und die salzsaure-wässerige Phase bei 4° zur Kristallisation stehengelassen. Die gelbbraunen Kristalle wurden abgenutscht und mit Eiswasser bis zur neutralen Reaktion des Waschwassers gewaschen. Die Kristalle wurden zuerst 3 Stunden bei 100—105°, dann im Vakuumexsikkator über $CaCl_2$ getrocknet. Wir erhielten 15,28 g Rohprodukt, entsprechend einer Ausbeute von 73,5 %.

Reinigung des Rohproduktes

15,28 g rohe Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure wurden in 100 ml Aethanol und 150 ml Chloroform gelöst und mit wenig aktivierter Tierkohle 15 Minuten am Rückfluss gekocht. Die erkaltete Lösung wurde filtriert und durch eine Säule von 10 cm Aluminiumoxyd (Alox „Woelm" alkalifrei, Akt. Stufe I mit 4 % Wasser) fliessen gelassen, und diese mit 200 ml Chloroform nachgespült. Von den vereinigten Fraktionen wurde auf dem Wasserbad soviel Lösungsmittel abdestilliert, bis die Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure auszukristallisieren begann. Dann wurde bis zur völligen Fällung Petroläther zugegeben. Der Niederschlag wurde abfiltriert. Aus der eingeengten Mutterlauge konnte keine weitere Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure mehr gewonnen werden. Da die Kristalle noch leicht gelblich waren, wurden sie noch einmal in Chloroform gelöst und die Lösung mit Petroläther versetzt. Zur vollständigen Auskristallisation blieb die Lösung über Nacht bei 4° stehen. Die Kristalle wurden abfiltriert und mit wenig Petroläther gewaschen. Die Ausbeute an Endprodukt betrug 9,54 g. Die Totalausbeute (bezogen auf Dibromhexan) betrug somit 19 %.

Charakterisierung des Endproduktes

Farblose Kristalle vom Schmelzpunkt 172—174°. Das Präparat wurde auf Schleicher & Schüll-Papier 2043 b mit Isopropanol-Chloroform-Ammoniak 25 % (50:40:10) absteigend chromatographiert. Nach Entwicklung mit einer wässerigen Kaliumpermanganatlösung trat ein Fleck bei Rf 0,62—0,75 hervor. Zur Bestimmung der Radioaktivität auf dem Papierchromatogramm wurde letzteres in 1 cm breite Streifen geschnitten. Jedem Streifen wurde in einem Zählgläschen 1,7 ml Aethanol und 3,5 ml Scintillationsflüssigkeit (Toluol mit PPO und POPOP-Zusatz) zugegeben und die Aktivität im Scintillationszähler bestimmt. Das Radiochromatogramm zeigte ein Maximum bei Rf 0,73. Das erhaltene Produkt war somit radiochromatographisch reine Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure.

Die spezifische Aktivität, im oben erwähnten Lösungsgemisch bestimmt, betrug $1{,}345 \cdot 10^3$ c/min · mg.

E. Experimentelles

1. Gewinnung von aktiven Metaboliten

a) Verfütterung von Aethyl-cycloheptenyl-(1′-^{14}C-)*barbitursäure.* Ein 29,5 kg schwerer Hund erhielt während 10 Tagen je 500 mg der signierten Verbindung in einer Gelatinekapsel. Das Tier blieb während der ganzen Versuchsdauer in einem Stoffwechselkäfig. Der Harn wurde insgesamt während 12 Tagen aufgefangen, d. h. noch während 48 Stunden nach der letzten Verabreichung.

b) Aufarbeitung des Harnes. Die Harnmenge von 24 Stunden wurde jeweils mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH 4—5 eingestellt und während 24 Stunden im Extraktionsapparat nach Kutscher und Steudel mit Äther extrahiert. Die Ätherauszüge wurden vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet und auf 250 ml eingeengt. Der dunkelbraune Rückstand blieb einige Tage bei 4° stehen, wodurch dunkelbraunes Material auskristallisierte, das abfiltriert wurde. Die Dünnschichtchromatographie des Filtrates zeigte, dass es alle drei Metaboliten Ia, Ib und II enthielt, während die Kristalle nur aus den Metaboliten Ia und Ib bestanden. Filtrat und Niederschlag wurden getrennt weiter verarbeitet.

2. Trennung der Metaboliten

Zur Herstellung der Säule wurde Kieselgel „Merck" für Chromatographie mit 3 n Salzsäure gewaschen und durch mehrmaliges Aufschlämmen in dest. Wasser vom feinsten Staub befreit. Das neutral gewaschene Kieselgel wurde unter gelegentlichem Umrühren bei 110—120° und anschliessend im Vakuumexsikkator fertig getrocknet. Es wurde durch ein 100-mesh-Sieb vom Grobkörnigen befreit. Das Kieselgel wurde in trockenem Äther, 2 Vol % Eisessig enthaltend, aufgeschwemmt und in eine Kolonne von 30 · 400 mm gefüllt. Die Füllhöhe betrug ca. 33 cm.

a) Trennung der Metaboliten Ia und Ib im Niederschlag. Die Rohkristalle wurden in gesättigter Essigesterlösung auf die Säule gebracht. Als Elutionsmittel diente die Äther-Eisessigmischung. Nachdem eine erste gelbbraune, aus Harnbestandteilen bestehende Bande durchgeflossen war, wurde die Säule auf einen Fraktionensammler montiert. Die plattenchromatographische Untersuchung der Fraktionen zeigte folgende Trennung:

Fraktionen 15—21: Metabolit Ia
Fraktionen 22—54: Metaboliten Ia und Ib
Fraktionen 55—80: Metabolit Ib

Die Fraktionen 22—54 wurden vereinigt, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Die Chromatographie dieser Fraktionen gab wieder eine unvollständige Trennung:

Fraktionen 20— 32: Metabolit Ia
Fraktionen 33— 63: Metaboliten Ia und Ib
Fraktionen 64—100: Metabolit Ib

Nach drittmaliger Chromatographie ergab sich folgende Trennung:

Fraktionen 10—14: Metabolit Ia
Fraktionen 15—36: Metaboliten Ia und Ib
Fraktionen 37—50: Metabolit Ib

b) Trennung der Metaboliten Ia, Ib und II im Filtrat. Das Filtrat wurde auf einige ml eingeengt und auf die Säule aufgetragen. Nachdem 400—500 ml Elutionsmittel durchgeflossen waren, wurde die Kolonne auf den Fraktionensammler montiert. Die chromatographische Untersuchung der Fraktionen zeigte folgende Trennung:

Fraktionen 1— 10: Metaboliten Ia und Ib
Fraktionen 11— 50: Metabolit Ib
Fraktionen 51—100: Metabolit II

Die Fraktionen mit reinem Metaboliten Ia, Ib und II wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert.

3. Oxydativer Abbau der Metaboliten Ia und Ib

a) Metabolit Ia. 0,264 g (0,1 m Mol) Metabolit Ia wurden in 150 ml Wasser, 0,414 g Kaliumkarbonat enthaltend, gelöst. Dieser Lösung wurden eine Lösung von 1,67 g Natriummetaperjodat in 150 ml Wasser und 2 ml 0,1 m Kaliumpermanganat zugegeben. Nach 24 Stunden wurde die rotbraune Lösung mit 10 ml Schwefelsäure angesäuert und das entstandene Jod, Jodat und überschüssige Perjodat mit Schwefeldioxyd reduziert. Die farblose Lösung wurde während 24 Stunden kontinuierlich mit Äther extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels und Umkristallisation des Rohproduktes aus Wasser wurden 70 mg Adipinsäure Smp. 150—152° erhalten.

b) Metabolit Ib. 0,133 g (0,05 m Mol) Metabolit Ib und 0,207 g Kaliumkarbonat wurden in 100 ml Wasser gelöst. Diese Lösung wurde mit einer Lösung von 0,835 g Natriumperjodat in 100 ml Wasser, 1 ml 0,1 m Kaliumpermanganat enthaltend, versetzt. Im übrigen wurde wie für Metabolit Ia vorgegangen. Es konnten 40 mg Adipinsäure Smp. 150 bis 152° isoliert werden.

F. Ergebnisse und Diskussion

1. Metaboliten Ia und Ib

Die Aktivitäten der Metaboliten und der daraus erhaltenen Adipinsäuren wurden in 1,7 ml Aethanol und 3,5 ml Scintillationsflüssigkeit gemessen. Die spezifischen Aktivitäten sind in folgender Tabelle wiedergegeben.

	c/min · mg	c/min · μMol
Metabolit Ia	1 235	326
Adipinsäure aus Ia	2 215	324
Metabolit Ib	1 236	329
Adipinsäure aus Ib	2 245	328

Die Metaboliten und ihre homologen Oxydationsprodukte weisen praktisch die gleichen molaren Aktivitäten auf. Die Abweichungen betragen 0,6 bzw. 0,3 % zwischen Metabolit und Adipinsäure, 0,9 % zwischen Metabolit Ia und Ib und 1,2 % zwischen beiden Adipinsäuren. Diese minimen Abweichungen, durch Wägungs- und Messfehler bedingt, sind vernachlässigbar. Es ergibt sich somit, dass die ganze Aktivität der Metaboliten in den Adipinsäuren erhalten bleibt, und aus den theoretischen Überlegungen kann man schliessen, dass sich die Carbonyl- und Hydroxylgruppen in Stellung 3′ befinden. Folgedessen kann Metabolit Ia als 5-Aethyl-5-(3′-oxo-Δ^{1}′-cycloheptenyl-)barbitursäure und Metabolit Ib als 5-Aethyl-5-(3′-hydroxy-Δ^{1}′-cycloheptenyl-)barbitursäure eindeutig charakterisiert werden.

2. Metabolit II

Die C, H-Bestimmung und die spektrographischen Messungen ergeben, dass Metabolit II ein Oxydationsprodukt der Aethyl-cycloheptenyl-barbitursäure mit einer zusätzlichen OH-Gruppe ist. Die Tatsache, dass dieser Metabolit mit Kobaltnitrat und Kaliumpermanganat reagiert, deutet ebenfalls darauf hin, dass einerseits ein Barbiturat und anderseits die Doppelbindung des Heptenylringes vorliegen. Metabolit II ist bis auf die Position der OH-Gruppe mit Ib identisch. Auch die schwierige Trennung von Metabolit II von den Metaboliten Ia und Ib zeigt, dass es zwei sehr ähnliche Verbindungen sind. Die verschiedenen Rf-Werte der Metaboliten Ib und II lassen aber deutlich erkennen, dass es sich um zwei verschiedene Substanzen handelt.

Nach Gaben von 5-Cyclohexenyl-1,5-dimethyl-barbitursäure an Kaninchen konnte Yoshimura (34) unter anderem 2 Hydroxyderivate aus dem Harn isolieren. Die beiden Metaboliten lassen sich chromatographisch an Alox trennen und wurden als diastereoisomere Verbindungen mit der OH-Gruppe in Stellung 3′ identifiziert. Beide Verbindungen zeigen die gleiche Absorption im UV und ähnliche IR-Spektren. Sie unterscheiden sich lediglich durch die optische Drehung und den Schmelzpunkt. Ein Metabolit mit der Hydroxylgruppe in Stellung 6′ wurde hingegen nicht gefunden. Die ähnlichen analytischen Daten von Metabolit Ib und II und die ähnliche Metabolisierung von 5-Aethyl-5-cycloheptenyl-barbitursäure und 5-Cyclohexenyl-1,5-dimethyl-barbitursäure lassen vermuten, dass es sich bei Metabolit Ib und II ebenfalls um isomere Verbindungen handelt.

Zusammenfassung

1. Anhand von zwei Beispielen, einer tritierten und einer ^{14}C-markierten Verbindung, werden Anwendungsmöglichkeiten der Isotopensignierung für die Untersuchung von Verteilung und Metabolismus körperfremder Substanzen gezeigt.

2. Die vorliegenden Kenntnisse über die Verteilung von 5-Aethyl-5-(1-methylbutyl-)barbitursäure und einigen pharmakologisch wirksamen Substanzen im Zentralnervensystem werden kurz dargestellt.

3. Die Herstellung einer Tritium-signierten Aethyl-methylbutyl-barbitursäure wird angegeben.
   Ihr Na-Salz wird nach peroraler Verabreichung an Ratten im Verlaufe einer Stunde nur zur Hälfte resorbiert.
   Die Anreicherung im Gesamt-Gehirn erreicht nach einer Stunde bereits ein Maximum von ca. 100 γ, sinkt nach 2 Stunden schon merklich ab, um nach 24 Stunden auf die Hälfte abzufallen.
   Die spezifische Aktivität des Blutes ist nach einer Stunde derjenigen der ZNS-Abschnitte ähnlich, nach 2 Stunden nahezu doppelt so gross. Bei länger dauernden Versuchen liegen die Blutwerte unter denjenigen der ZNS-Abschnitte.
   Die anfänglich etwas unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten der einzelnen Abschnitte des ZNS sind nach 2 Stunden annähernd gleich. Das Rückenmark zeigt durchwegs die kleinste Aktivität. Nach 24 Stunden weist das Nachhirn die höchste Konzentration aller ZNS-Abschnitte auf.

4. Eine Methode zur Isolierung der Hauptmetaboliten Ia, Ib und II der 5-Aethyl-5-cycloheptenyl-barbitursäure aus dem Harn von Hunden und deren Strukturaufklärung mit Hilfe einer ^{14}C-signierten Verbindung wird beschrieben.
   Eine Synthese der ^{14}C-signierten 5-Aethyl-5-cycloheptenyl-(1′-^{14}C-) barbitursäure wird angegeben.

5. Metabolit Ia wurde als 5-Aethyl-5-(3′-oxo-Δ′-cycloheptenyl-)barbitursäure und Metabolit Ib als 5-Aethyl-5-(3′-hydroxy-Δ′-cycloheptenyl-) barbitursäure identifiziert.

6. Metabolit II zeigt grösste Ähnlichkeit mit Metabolit Ib. Die beiden Metaboliten unterscheiden sich lediglich durch die Stellung der Hydroxylgruppe.

LITERATURVERZEICHNIS

1. H. Sheppard, T. F. Mowles, N. Bowen, A. A. Renzi u. A. J. Plummer: Toxicol. Appl. Pharmacol. **2**, 188 (1960).
2. R. F. Glascock u. E. S. Pope: Biochem. J. **75**, 328 (1960).
3. K. E. Wilzbach: J. Am. Chem. Soc. **79**, 1013 (1957).
4. B. B. Brodie, J. J. Burns, L. C. Mark, P. A. Lief, E. Bernstein u. E. M. Papper: J. Pharmacol. Exper. Therap. **109**, 26 (1953).
5. J. B. Kahn: J. Pharmacol. Exper. Therap. **98**, 16 (1950).
6. K. Bernhard, U. Bühler u. M. H. Bickel: Helv. Chim. Acta **42**, 802 (1959).
7. St. Goldschmidt, W. Lamprecht u. E. Helmreich: Z. physiol. Chem. **292**, 125 (1953).
8. E. W. Maynert, H. B. v. Dyke: J. Pharmacol. Exper. Therap. **98**, 22 (1950).
9. L. J. Roth, E. Leifer, J. R. Hogness u. W. H. Langham: J. biol. Chem. **178**, 963 (1949).
10. E. Titus u. H. Weiss: J. Biol. Chem. **214**, 807 (1955).
11. St. Goldschmidt, Fr. W. Koss: Z. physiol. Chem. **316**, 224 (1959).
12. K. Bernhard, M. H. Bickel: Helv. Physiol. Acta **15**, C 50 (1957).
13. St. Goldschmidt u. R. Wehr: Z. physiol. Chem. **308**, 9 (1957).
14. J. Bäumler: Mitt. Lebensm. Hyg. **48**, 135 (1957).
15. A. Wickström u. B. Salvesen: J. Pharm. Pharmacol. **4**, 98 (1952).
16. E. M. Pearce, F. De Venuto, W. M. Fitch, H. E. Firschein u. U. Westphal: J. Anal. Chem. **28**, 1762 (1956).
17. R. Pulver: Schweiz. Med. Wschr. **73**, 124 (1943).
18. M. H. Bickel: Diss. Basel 1960.
19. E. Stahl: Pharmazie **11**, 633 (1956).
20. A. W. Dox: J. Am. Chem. Soc. **58**, 1634 (1936).
21. K. D. Parker u. P. L. Kirk: Anal. Chem. **33**, 1378 (1961).
22. J. G. H. Cook, C. Riley, R. F. Nunn u. D. E. Budgen: J. Chromatography **6**, 182 (1961).
23. F. Fretwurst, J. Halberkann u. F. Reiche: Münch. Med. Wschr. **79**, 1429 (1932).
24. M. T. Bush, T. C. Butler u. H. L. Dickison: J. Pharmacol. Exper. Therap. **108**, 104 (1953).
25. H. Tsukamoto, E. Takabatake u. H. Yoshimura: Pharmac. Bull./Tokyo **2**, 201 (1954).
26. H. Tsukamoto, H. Yoshimura u. S. Toki: Pharmac. Bull./Tokyo **3**, 239 (1955).
27. H. Tsukamoto, H. Yoshimura: Pharmac. Bull./Tokyo **3**, 397 (1955).
28. E. v. Rudloff: J, Am. Oil Chem. Soc. **33**, 126 (1956).
29. K. Ziegler, H. Eberle u. H. Ohlinger: Liebigs Ann. Chem. **504**, 94 (1933).
30. K. Ziegler, L. Jakob, H. Wollthan u. A. Wenz: Liebigs Ann. Chem. **511**, 64 (1934).
31. Houben-Weyl: Methoden d. Org. Chemie, Vol. 4/2, p. 758, Verlag G. Thieme, Stuttgart, 1955.
32. H. Gilman, E. A. Zoellner u. W. M. Selby: J. Am. Chem. Soc. **54**, 1957 (1932).
33. K. Ziegler, F. Crössmann, H. Kleiner u. O. Schäfer: Liebigs Ann. Chem. **473** 19 (1929).
34. H. Yoshimura: Pharmac. Bull./Tokyo **5**, 561 (1957).

CURRICULUM VITAE

Ich, Jean-Daniel Alexandre Goetschel, Bürger von Löwenburg-Pleigne/Bern, wurde am 13. Oktober 1930 als Sohn des Edmond, Advokat in Basel, und der Renée Goetschel-Dreyfus, in Basel geboren.

Ich besuchte die Primarschule und das Progymnasium in Château-d'Oex/VD. 1950 legte ich die Maturität (Typus B) am Gymnase classique cantonal in Lausanne ab.

1950 begann ich mein Pharmaziestudium an der Universität Basel, das ich 1957 mit der eidgenössischen pharmazeutischen Fachprüfung abschloss. Vorlesungen und Praktika besuchte ich bei folgenden Damen und Herren Professoren: H. Baur, K. Bernhard, K. Bucher, H. Erlenmeyer, M. Geiger-Huber, P. Huber, E. Iselin, K. Leupin, K. Meyer, T. Reichstein, E. Rothlin, J. Tomcsik, I. Tschudi-Steiner, W. Vischer.

Meine 1958 angefangene Dissertation entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Karl Bernhard am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Basel. Seit 1959 bin ich an diesem Institut als Assistent tätig.